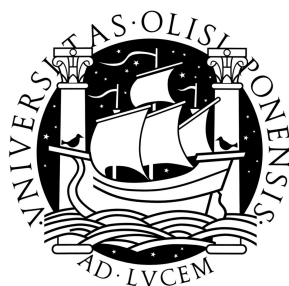


**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**



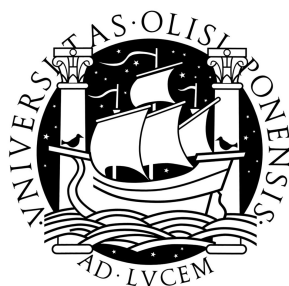
**PESQUISA DE ACTIVIDADE INIBITÓRIA DO ENZIMA
ACETILCOLINESTERASE EM EXTRATOS AQUOSOS DE VÁRIAS
PLANTAS USADAS COMO INFUSÕES.
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
COM MAIOR ACTIVIDADE INIBITÓRIA**

Mariana Morais Pedro

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Lisboa, 2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Mariana Morais Pedro

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

Dissertação de tese orientada pela Prof^a Doutora
Maria Luísa Mourato de Oliveira Marques Serralheiro

Lisboa, 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro pela orientação científica e dedicação que prestou ao trabalho desenvolvido, sem a qual não seria possível realizar esta dissertação.

Ao Professor Doutor Belarmino Barata pela sua orientação na escolha do tema da dissertação.

Ao Pedro Falé agradeço a sua disponibilidade, boa disposição, ajuda e presença constante nos momentos difíceis.

Agradeço a direcção da DBM em especial à Beatriz pela sua presença amiga, animadora e encorajadora na procura de novos horizontes para a vida sócio-profissional.

Quero agradecer à Catarina pelos bons momentos passados e pelos dias maravilhosos proporcionados.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo apoio moral, em especial, à Alda pela ajuda na obtenção das plantas.

Quero agradecer aos Doutores Paulo Madeira e José Gonçalo Deira Justino pelo apoio incondicional na obtenção dos espectros de massa.

Ao meu filho Joel Levi e ao meu sobrinho Hélio Emanuel, peço desculpa pelos momentos em que os privei da minha companhia e atenção, mas, vocês foram a minha grande força para a realização deste trabalho.

Agradeço às minhas amigas, Elsa, Manuela, América, D. Assunção e Cláudia e a todos quanto me puderam ajudar de uma forma directa ou indirecta.

RESUMO

Neste trabalho foram estudados onze extractos aquosos de infusões de doze plantas usadas na medicina tradicional portuguesa e angolana.

Assim sendo, foram usadas infusões das seguintes plantas: *Citrus x sinensis* L. (flor de laranjeira), *Equisetum arvense* L. (cavalinha), *Ginkgo biloba* L., *Mentha x piperita* L. (hortelã-pimenta), *Lippia* sp. (N'dembi), *Pterospartum tridentatum* L. (carqueja), *Persea americana* Mill. (abacateiro), *Petroselinum crispum* L. (salsa), *Tabebuia avellanedae* Mill (pau de arco), *Zea mays* L. (barba de milho) e, ainda, uma mistura constituída pelas espécies *Eucaliptus glóbulus* L. e *Pinus pinaster* Ait (Eucalipto e Pinheiro).

Determinou-se a actividade inibitória daqueles extractos sobre o enzima acetilcolinesterase através do método de Ellman e calculou-se o valor da concentração de extracto que origina uma inibição da actividade enzimática em 50% (IC₅₀). Dos extractos estudados, as infusões de *Lippia* sp. (N'dembi) e de *Ginkgo biloba* L. apresentaram uma maior percentagem de inibição com valores de IC₅₀ de 0,18±0,02 mg/mL e de 0,25±0,02 mg/mL, respectivamente.

A actividade antioxidante das diferentes infusões estudadas foi determinada através do método do DPPH. Para tal, calculou-se o valor da concentração de extracto responsável pela extinção do radical em cerca de 50%, (EC₅₀). O melhor resultado foi obtido com o extracto de *Ginkgo biloba*, o qual apresentou um valor de EC₅₀ de 2,6±0,3 µg/mL.

Quantificou-se os fenóis totais usando o reagente de Folin-Ciocalteu, tendo sido usado como padrão: o pirogalol. Os resultados demonstraram a presença de fenóis em todos extractos das plantas estudadas. Os melhores resultados foram obtidos com a *Ginkgo biloba* (315 µg/mg de extracto) e a *Pterospartum tridentatum* (307 µg/mg de extracto) e foram expressos em equivalente de pirogalol/mg de extracto.

A identificação dos compostos bioactivos, responsáveis pela inibição do enzima acetilcolinesterase, foi feita apenas nos extractos de *Ginkgo biloba* e *Lippia* sp., uma

vez que estes apresentaram valores de IC_{50} superiores aos dos restantes extractos estudados. Para a pesquisa dos compostos naqueles extractos recorreu-se às técnicas de HPLC-RP-DAD. Os cromatogramas e os espectros obtidos na região da radiação UV foram comparados com os de diversos padrões, o que permitiu concluir que para o *Lippia* sp. contém um derivado do ácido cafeíco, ácido rosmarínico e rutina. Para a *Ginkgo biloba* os picos detectados correspondem a estrutura de flavonóides ou compostos semelhantes como é o caso da epigallocatequina, que foi identificada por MS.

Simulou-se *in vitro* a degradação do extracto aquoso da *Ginkgo biloba* pelo tracto gastrointestinal usando-se uma solução de suco gástrico e pancreático artificial. Verificou-se que em ambas os casos ocorreu a degradação dos compostos, tendo esta sido mais acentuada pelo suco pancreático.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, doença de Alzheimer, antioxidante, extracto aquoso

ABSTRACT

The aim of this work was to study eleven extracts of infusions of twelve plants usually used in traditional medicine of Portugal and Angola.

The plants studied were *Citrus x sinensis* L., *Equisetum arvense* L., *Ginkgo biloba* L., *Mentha x piperita* L., *Lippia* sp., *Pterospartum tridentatum* L., *Persea americana* Mill., *Petroselinum crispum* L., *Tabebuia avellanedae* Mill, *Zea mays* L., and also a mixture of the species *Eucaliptus glóbulus* L. e *Pinus pinaster* Ait.

The extracts ability to inhibit acetylcholinesterase activity was evaluated using Ellman's method. The concentration of extract which inhibits acetylcholinesterase activity in 50 % (IC₅₀) was determined. The infusions of *Lippia* sp. and *Ginkgo biloba* L. were the most efficient, with IC₅₀ of 0.18±0.02 mg/mL and 0.25±0.02 mg/mL, respectively.

The antioxidant activity of the different extracts used in this study was investigated using DPHH method. The concentration of extract which extinct DPHH activity in 50 % (EC₅₀) was determined. The extract of *Ginkgo biloba* L. revealed to be the most efficient, presenting an EC₅₀ value of 2.6±0.3 µg/mL.

The total quantity of phenols was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and the standard reagent used was pirogallol. These experiences showed the presence of phenols in the eleven extracts studied. The extracts of *Ginkgo biloba* L. and *Pterospartum tridentatum* revealed to be the most efficient of all with 315 µg/mg of extract and 315 µg/mg of extract, respectively. The results were expressed in equivalents of pirogallol/mg of extract.

The identification of the bioactive compounds which are responsible for the inhibition of acetylcholinesterase activity was done, only, with the extracts of *Ginkgo biloba* and of *Lippia* sp. once they exhibit the highest values of IC₅₀. To investigate which compounds were present in these two extracts HPLC-RP-DAD techniques were used. Chromatograms and spectra obtained in the presence of UV radiation were compared with those of various compounds used as standards. So, it can be concluded that *Lippia* sp. is composed by one compound derivate from caffeic acid, rosmarinic acid and rutine. Otherwise, *Ginkgo biloba* peaks suggest the presence of flavonoids or similar compounds, such as epigallocatechin which was identified by MS.

The degradation of aqueous extract of *Ginkgo biloba* by gastrointestinal tract was simulated using solutions of gastric and artificial pancreatic juice. It was observed that, in both cases, that compound degradation occurred, although that was higher in the presence of pancreatic juice.

Key Words: Acetylcholinesterase, Alzheimer disease, extract, antioxidant, aqueous extract

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Objectivo.....	xi
I – Introdução.....	1
1. Plantas Medicinais.....	3
1.1. Breve abordagem.....	3
1.2. Abacateiro.....	4
1.3. Milho.....	5
1.4. Carqueja.....	6
1.5. Cavalinha.....	7
1.6. Eucalipto.....	8
1.7. Laranjeira.....	9
1.8. <i>Ginkgo Biloba</i>	10
1.9. Hortelã-pimenta.....	11
1.10. N'Dembi.....	12
1.11. Pau de Arco.....	13
1.12. Pinheiro.....	14
1.13. Salsa.....	15
2. Doença de Alzheimer.....	16
2.1. Inflamação stress oxidativo na doença de Alzheimer.....	17
2.2. Acetilcolinesterase como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer	21

II – Materiais e Métodos.....	25
2.1. Material Vegetal.....	27
2.2. Reagentes Químicos.....	27
2.3. Equipamentos.....	28
2.4. Preparação de Extractos.....	28
2.5. Inibição da actividade da Acetilcolinesterase.....	28
2.6. Actividade antioxidante pelo DPPH.....	29
2.7. Quantificação dos Fenóis Totais.....	30
2.8. Cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP).....	29
2.9. Espectrometria de massa.....	31
2.10. Degradação dos extractos pelo suco gástrico.....	32
2.11. Degradação dos extractos pelo suco pancreático.....	32
III – Resultados e Discussão.....	35
3.1. Obtenção de extractos.....	37
3.2. Inibição da actividade da Acetilcolinesterase.....	38
3.3. Actividade antioxidante pelo DPPH.....	41
3.4. Quantificação dos Fenóis Totais.....	43
3.5. Análise integrada de resultados.....	45
3.6. Análise dos extractos por HPLC-RP-DAD.....	46
3.7. Identificação de compostos Isolados por espectrometria de massa..	51
3.8. Degradação enzimática do extracto de <i>Ginkgo biloba</i>	53
3.8.1. Degradação enzimática do extracto de <i>Ginkgo biloba</i> pelo suco gástrico.....	54
3.8.2. Degradação enzimática do extracto de <i>Ginkgo biloba</i> pelo suco pancreático.....	55
IV- Conclusões e Perspectivas Futuras.....	57
4.1. Conclusões.....	59
4.2. Perspectivas Futuras.....	60
IV- Referências Bibliográficas.....	61

ABREVIATURAS

A β	Proteína- β -amilóide
AchI.....	Acetilcolina iodada
AchE.....	Acetilcolinesterase
APP.....	Proteína percursora do β -amilóide
Asp.....	Resíduo de ácido aspártico
BHT.....	Hidroxitolueno butilado (2,6-di- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -cresol)
DA.....	Doença de Alzheimer
DAD.....	(do inglês <i>diode array detector</i>)
DPPH.....	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB.....	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
E (%).....	Percentagem de extinção do DPPH
EC ₅₀	Concentração à qual corresponde 50% de extinção do DPPH
ESI.....	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
Glu.....	Resíduo de glutamina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
His.....	Resíduo de histidina
HPLC.....	Cromatografia de alta precisão
.....	(do inglês <i>high precision liquid chromatography</i>)
IC ₅₀	Concentração à qual corresponde 50% de inibição
min.....	minutos
MS.....	Espectrometria de massa (mass spectrometry)
m/z.....	Razão entre a massa e a carga do ião
Phe.....	Resíduo de fenilalanina
PCR.....	Proteína C Reactiva
ROS.....	Espécies reactivas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
rpm.....	Rotações por minuto
tr.....	Tempo de retenção (do inglês <i>retention time</i>)

Ser.....Resíduo de serina
SNC.....Sistema nervoso central
Trip.....Resíduo de tripsina
Tyr.....Resíduo de tirosina
TNF- αfactor de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)
UV.....radiação ultravioleta (200 - 400 nm)

OBJECTIVOS

O uso de plantas sob a forma de “chás” com fins medicinais tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional, tendo uma abrangência comum em todos os continentes.

O estudo dos compostos bioactivos presentes em algumas plantas usadas medicinalmente tem sido alvo de investigação intensa no que se relaciona com o desenvolvimento de fármacos úteis na cura ou profilaxia de vários tipos de doenças neurodegenerativas (*e.g.*, doença de Alzheimer).

Este trabalho teve como objectivo a análise e avaliação de propriedades bioactivas de onze plantas muito usadas na medicina tradicional portuguesa e angolana, e envolveu a:

- 1º- Pesquisa da actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase em extractos aquosos obtidos das infusões das diversas plantas usadas neste trabalho;
- 2º- Identificação dos compostos com maior actividade inibitória daquele enzima;
- 3º- Estudo *in vitro* da degradação dos compostos bioactivos pelo tracto gastrointestinal.

I- INTRODUÇÃO

1. PLANTAS MEDICINAIS

1.1 - Breve abordagem

Desde os tempos mais ancestrais que, nos diferentes continentes, as plantas são empregues com fins medicinais, profiláticos ou terapêuticos constituindo, deste modo, um arsenal para restauro da saúde. Esta prática nos países ditos desenvolvidos, como a Alemanha e os Estados Unidos da América, foi perdendo o seu interesse com o desenvolvimento da síntese química e farmacológica de drogas sintéticas e semi-sintéticas (Kupeli *et. al.*, 2007). Devido a factores associados a contra indicações e efeitos hepatotóxicos destas drogas assiste-se, nos últimos tempos, a uma crescente procura de plantas medicinais. Os avanços tecnológicos, o interesse dos investigadores pelos mais diversos temas relacionados com o estudo das plantas, a investigação científica, a biodiversidade e a biodisponibilidade entre outros, conduzem à descoberta de substâncias (princípios activos) responsáveis pelas propriedades medicinais das plantas. Esta pesquisa permitiu, ainda, a produção de novos fármacos. As plantas medicinais, para além dos constituintes activos, possuem outros metabolitos que podem influenciar a sua acção, protegendo-os de oxidações ou hidrólises, permitindo a sua maior absorção no organismo, justificando assim, que a acção da planta ou extracto, em certos casos, tenha maior actividade. Alguns destes metabolitos isolados podem ser ácidos orgânicos, ésteres de ácidos aromáticos que se apresentam em forma de sais (*e.g.*, salicina, ácido cafeico, rosmarínico, clorogénico, fumárico e cumárico), alcalóides, taninos, glúcidos, flavonóides (*e.g.*, canferol e quercitina), óleos essenciais, óleos gordos e resinas, entre outros (Proença *et. al.*, 2003).

Neste trabalho far-se-á uma breve abordagem a doze plantas usadas na medicina tradicional. Utilizou-se como objecto de pesquisa extractos aquosos das mesmas, no que se relaciona à sua capacidade para inibir o acetilcolinesterase (AChE) e à sua actividade antioxidante.

1.2 - Abacateiro

O abacateiro, *Persea americana* Mill, (Figura 1) é uma árvore originária da América Latina, é uma espécie da família Laureaceae, cultivada em África e na América e em algumas regiões mediterrânicas, e.g., Portugal. A parte mais utilizada são os frutos e as folhas. Entre os vários metabolitos estudados e isolados destacam-se os seguintes: óleos essenciais, ácidos gordos, ésteres de ácidos gordos (tais como os ácidos palmitoleico, oleico e linolénico), sais minerais (fósforo, ferro), vitaminas do complexo B, aminoácidos (valina, leucina, lisina e os ácidos aspártico e glutâmico), fitosteróis, tocoferóis, flavonóides, glúcidos e taninos.

Em fitoterapia, os óleos obtidos do fruto são usados como protectores e regeneradores da pele, protegendo proteases e collagenases tecidulares em situações de inflamação. São, ainda, constituintes de muitos cosméticos e fonte de pró-vitaminas lipossolúveis. As folhas são usadas no tratamento de diarreias inespecíficas, inflamações e situações de hipertensão, raquitismo, bronquite, tuberculose, cólicas, dores de cabeça, gases intestinais, flatulência e como afrodisíaco (Proença *et. al.*, 2003).



Figura 1- Folhas e frutos de abacateiro (<http://wikipedia.org/wiki./ab>).

1.3 – Milho

A planta milho, *Zea mays* L., (Figura 2) pertence à família das Poaceae, é uma planta anual nativa dos Andes e América Central cultivada em quase todos os continentes. Faz parte da alimentação de vários povos, devido ao seu grande valor nutricional sendo, ainda, altamente energético. As partes utilizadas desta planta são os estiletes e estigmas das barbas de milho. As folhas são usadas para conservação de alimentos (Proença *et. al.*, 2003; Maksimovic *et. al.*, 2005).

Entre os metabolitos secundários dos estigmas e estiletes das barbas de milho pode ser enumerados os sais de potássio, os flavonoides, as aminas, os enzimas e taninos, bem como, vestígios de óleos essenciais e ácido salicílico. O óleo de milho tem fitoesteróis, ésteres glicéricos de ácidos gordos com predominância dos ácidos gordos insaturados ómega 3 e 6, carotenóides e tocoferóis.

A barba de milho é usada como diurético, em afecções genitourinárias, gota, edema e obesidade acompanhada de retenção de líquidos. O óleo do milho é usado na prevenção da hipercolesterolemia, arteroesclerose, eczemas secos e outras distorções da mucosa (Proença *et. al.*, 2003; Velazquez *et. al.*, 2005)



Figura 2 – Planta do milho, estigma, estilete e folhas (retirado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Maize>).

1.4 - Carqueja

A carqueja, *Pterospartum tridentatum*, L., (Figura 3) é uma planta pertencente à família das Fabaceae, cresce espontaneamente, podendo encontrar-se em Portugal, África e América do Sul. As partes mais utilizadas desta planta são as flores na preparação de infusões e pratos culinários (*e.g.*, arroz de carqueja).

Os seus principais metabolitos secundários são álcoois sesquiterpénicos, ésteres terpénicos, α - e β – pineno, flavónoides, alcalóides, óleo essencial (*e.g.*, carquejol e acetato de carquejilo).

É indicada para afecções febris, gástricas, intestinais, vias urinárias, hepáticas e biliares, bem como, na obstipação, gengivite, gota e hipertensão (Grosso *et. al.*, 2007).



Figura 3 – Planta da carqueja, folhas e flores
(http://pt.wikipedia.org/wiki/Pterospartum_tridentatum).

1.5 - Cavalinha

A cavalinha, *Equisetum arvense* L., (Figura 4) pertence à família das *Equisetaceae* e é uma planta nativa da Europa, sendo ainda plantada na África, América e Ásia. Existe em quase todo o território Português. As partes aéreas estéreis são as mais utilizadas.

Os principais metabolitos secundários da planta são: sais minerais (de silício e potássio), heterósidos de flavónoides, glúcidos, taninos, vitamina C (ácido ascórbico), ácidos fenólicos, manitol e inositol.

Em fitoterapia é indicada no tratamento de doenças como osteoporose, na consolidação de fracturas, doenças reumáticas, infecções genitourinárias, anemias úlceras dérmicas, inflamações da faringe, prevenção da litíase, obesidade acompanhada de retenção de líquidos, depressão e hipotensão. Apresenta propriedades remineralizantes e tonificantes do tecido conjuntivo devido à presença de quantidades elevadas de sais de silício e potássio; contribui para o aumento das defesas imunitárias (Proença *et. al.*, 2003).



Figura 4 – Cavalinha parte aérea, retirado de ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Cavalinha \(planta\)\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cavalinha_(planta)))

1.6 - Eucalipto

O eucalipto, *Eucalyptus globulus* L., (Figura 5) pertence à família das *Mirtaceae*, é uma árvore originária da Austrália e é cultivada em regiões temperadas, tropicais e sub-tropicais, muito cultivada em Portugal, sendo as partes mais utilizadas desta planta as folhas jovens sem pecíolo.

Composição química: óleo essencial com 70% de cineol e eucaliptol monoterpenos, 25% de α -pineno, limoneno, azuleno, taninos, resinas, flavonas, entre outros.

As infusões das folhas são usadas no tratamento de resfriados, gripes, bronquites, tosse, infecções pulmonares e inflamações oro faríngeas.



Figura 5 – Eucalipto (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Eucalipto>).

1.7 - Laranjeira

A laranjeira, *Citrus x sinensis* L., (Figura 6), pertence à família das *Rutaceae*, é plantada em quase todo o mundo e pensa-se que tenha origem na Índia e nos Himalaias tendo sido, posteriormente, levada para África, Europa e América. Existem diversas variedades, o fruto apresenta vários sabores, amargo, ácido e doce, sendo fonte de vitamina C. As partes mais usadas são as flores, folhas e frutos.

Composição química: além de outros constituintes, as flores possuem óleos essenciais (limoneno, linalol, nerol), antranilato de metilo, antocianinas,

flavonóides e glúcidos; as folhas possuem pectinas, ácidos orgânicos (*e.g.*, ácido cítrico e benzóico).

As flores são usadas em situações de ansiedade, insónia, espasmos gastrointestinais, alterações neurodegenerativas; o pericarpo é usado como anti-séptico pulmonar e no aumento do apetite; os extractos de sementes são usados na colite ulcerosa, doença de Crohn e na redução de agentes patogénicos.



Figura 6 – Laranjeira frutos folhas e flores
(http://pt.wikipedia.org/wiki/Citrus_x_sinensis)

1.8 - *Ginkgo Biloba*

A *Ginkgo biloba* L. (Figura 7) pertence à família das *Ginkgoaceae*. É uma árvore considerada um fóssil vivo, originária da China, Japão e Coreia, sendo cultivada em quase todos os continentes. As suas folhas são verdes brilhantes em forma de leque. Pode atingir cerca de 40 metros de altura e durar cerca de 1000 anos. As partes mais utilizadas são as folhas e frutos. Devido à sua robustez, durabilidade e grande uso na medicina tradicional é uma das plantas mais estudadas, existindo sob a forma de extractos concentrados e em cápsulas. Alguns estudos indicam que foram isolados cerca de 40 compostos do metabolismo secundário das folhas, sendo os flavonóides e terpenóides os de maior importância devido à sua maior actividade biológica. No grupo dos terpenóides destacam-se os diterpenos (ginkgólidos A, B, C, J, E e M), sesquiterpenos (Bilobalido BB); e no grupo de flavonóides: os biflavonóides, bilobetol, ginkgetol, derivados da quercetol e do canferol); glícidos e ácidos gordos e fitosteróis (Singh *et. al.*, 2008; Proença *et. al.*, 2003).

Em fitoterapia é indicado em caso de diminuição do rendimento intelectual, perda de memória, zumbido, dores de cabeça, ansiedade, insuficiência vascular cerebral dos idosos, demência senil idêntica à doença de Alzheimer, prevenção da arteriosclerose, formação de trombos e *diabetes mellitus* (Proença *et. al.*, 2003).



Figura 7 – Folhas e frutos de *Ginkgo Biloba*
(http://en.wikipedia.org/wiki/Ginkgo_biloba)

1.9 - Hortelã-pimenta

A hortelã-pimenta, *Mentha x piperita* L., (Figura 8), pertence à família das *Lameaceae*. É uma planta cultivada na Europa, África e América. As partes mais usadas são as folhas inteiras e ramos. É tradicionalmente usada em culinária, como aromatizante, em infusões e como planta decorativa.

É constituída por óleos essenciais, por mentol, cineol, mentona, isomentona, limoneno, flavonóides, mentofurano, carvona, triterpenos, ácidos fenólicos (ácido picumárico, fenílico, cafeíco e rosmarínico) e constituintes amargos (Proença *et. al.*, 2003).

Em fitoterapia está indicada o seu uso no caso de distúrbios gastrointestinais, bem como antitússico, mucolítico, expectorante e descongestionante das vias respiratórias, flatulência, náuseas, vômitos, mialgias e estimulante.



Figura 8 – Hortelã-pimenta (<http://fotosviseu.blogspot.com/2007/06/hortel-pimenta-menta-mentha-piperita.html>).

1.10 -N'dembi

A planta **N'dembi**, *Lippia* sp., (Figura 9), pertence à família das *Verbenaceae* e cresce espontaneamente no Centro Norte, e Sul de Angola (Malanje, Bié, Huambo). É também conhecida com o nome de Capungo-pungo. É um sub-arbusto multicaule, com soca lenhosa, subterrânea, aromático, caules quadrangulares ásperos, de folhas opostas com pecíolo curto e limbo ovado com margem serrada, flores púrpuras, brancas, ou amareladas, bilabiadas agrupadas em inflorescências terminais e laterais densas com brácteas numerosas. As partes mais usadas desta planta são as folhas e as flores (Eric Bossard, 1996).

Os principais metabolitos secundários são flavonóides. Está indicada para cefaleias crónicas, febre, insónia, nevralgias, infecções pulmonares, digestivas, como peitoral em resfriamentos.



Figura 9 – Planta de N'dembi (foto tirada no jardim- Malanje-Angola)

1.11 - Pau de Arco

Pau de Arco, *Tabebuia avellanedae*. L., (Figura 10), pertence à família das *Bignoniaceae*, é árvore originária da floresta amazónica (Brasil, Argentina, México), é cultivada em África e em vários países da Europa. A parte da planta que é mais usada é a casca da árvore.

O pau de arco é muito rico em quinonas, compostos benzénicos, flavonóides (derivados da quercetina), e óleos essenciais (derivados de naftoquinonas, lapachol, L-menoquinona). Tem também resinas, sais minerais e alcalóides.

É usado em fitoterapia como anti-inflamatório, anti-cancerígeno, anti-fúngico, anti-bacteriano, anti-reumático e anti-tumoral; bem como, nas infecções cutâneas, queimaduras, micoses, mordedura de cobras entre muitas outras (Proença *et. al.*, 2003).

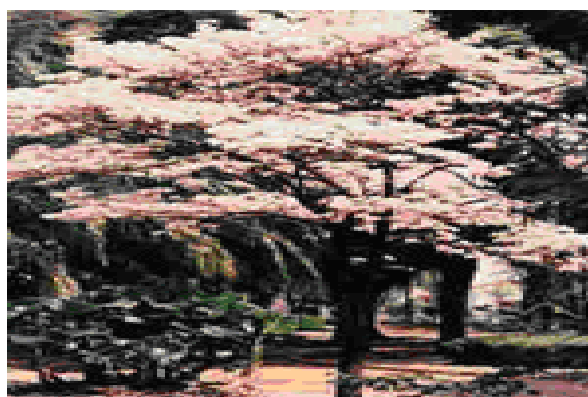


Figura 10 – Árvore de Pau de Arco (<http://performance.clix.pt/html>)

1.12 -Pinheiro

O pinheiro bravo, *Pinus pinaster* L., Figura 11, pertence à família das *Pinaceae*. É uma árvore originária da Europa mediterrânica muito cultivada em Portugal, na América, África e outros pontos do mundo. As partes utilizadas são a casca, as gemas e as agulhas.

Os principais metabolitos secundários encontrados nesta planta são o α - e β - pineno, limoneno, terpineno, mirceno, sabineno, ácido terpinoleico, flavonóides, resinas, taninos e leucocianol.

Em fitoterapia, as infusões e óleos essenciais estão indicados nas afecções respiratórias (gripe, bronquite e tosse), reumatismo e como analgésico percutâneo. O pinheiro pode ser misturado com folhas de eucalipto permitindo a preparação de infusões para o tratamento de resfriamentos (A. Proença *et. al.*, 2003).



Figura 11 – Pinheiro
(<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pinheiro>)

1.13 - Salsa

A salsa, *Petroselinum crispum* Mill., Figura 12, pertence à família das *Apiaceae*. É uma planta originária das regiões mediterrânicas, cultivada em quase todo o mundo, As folhas, raízes e frutos desta planta são as mais utilizadas, realçando-se o facto das folhas serem utilizadas na alimentação como condimento aromático

Os principais metabolitos secundários são óleos essenciais onde pode predominar o apiol, a menisticina, os α e β -pineno, flavónoides, sais minerais, taninos, bem como as vitaminas A, B1, B2, C e D.

Em fitoterapia é usada na dismenorreia, flatulência, cálculos renais e como diurético.



Figura 12 – Folhas de salsa ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Salsa \(planta\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Salsa_(planta)))

2 - DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma forma de demência que em todo mundo afecta uma grande parte da população de idosos, com idades compreendidas entre os 65-89 anos. Nos países ditos desenvolvidos, é considerada como um dos principais problemas de saúde pública, devido ao grande impacto que o indivíduo doente causa na família e na sociedade. Além disso, o crescimento da população nesta faixa etária é cada vez maior, estimando-se em cerca de 14 milhões (Kamer *et. al.*, 2008; Behl, 1997).

A DA é uma doença degenerativa do cérebro caracterizada pelo declínio das capacidades cognitivas, manifestando-se, inicialmente, por alterações de memória e, no estado mais agravado da doença, por alterações da personalidade, perda da fala, visão e até o não reconhecimento dos familiares mais próximos (Behl, 1997).

A DA foi descrita pela primeira vez pelo neurologista alemão Alois Alzheimer, em 1901, tendo este verificado a existência de placas senis numa doente com aquela doença. Hoje, estas placas estão identificadas como sendo proteína β -amilóide e proteína tau. As causas mais evidentes da DA estão associadas à incorrecção na estrutura terciária tridimensional da proteína β -amilóide. Esta proteína resulta da proteólise catalisada pela β -secretase e γ -secretase da proteína precursora da amilóide (APP) e a conformação errada de microfibrilhas intracelulares com uma forma fosforilada incorrecta de uma proteína associada a microtúbulos, a proteína tau (Chong *et. al.*, 2005; Stuchbury e Münch, 2005).

Os monómeros da proteína β -amilóide são hidrossolúveis, inócuos, podendo sofrer alterações conformacionais quando em elevadas concentrações, adquirindo uma estrutura terciária, que se agrega sob a forma de fibrilhas. As microfibrilhas depositam-se fora dos neurónios e formam-se placas senis (Figura13). Estas placas activam a libertação de compostos pró-inflamatórios pelas células gliais, uma resposta inflamatória da qual resulta neurodegeneração e, consequentemente, demência (Stuchbury e Münch, 2005; Smith *et. al.*, 2007).

A proteína tau está associada aos microtúbulos e actua na estabilização do citoesqueleto, esta sofre fosforilação e acumula-se em filamentos helicoidais emparelhados que, por sua vez, se agregam em massa dentro dos neurónios, contribuindo, deste modo, para a disfunção neuronal característica da doença de Alzheimer.

Alguns estudos feitos em pacientes portadores de DA, mostraram que estes apresentavam uma diminuição de acetilcolina no cérebro (Heinrich *et. al*, 2004). A acetilcolina é uma molécula que se encontra no cérebro e nas junções neuromusculares, fazendo parte do sistema nervoso parassimpático, está directamente envolvida na transmissão de sinais entre os neurónios, actuando como neurotransmissor. A nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina na fenda sináptica (diminuindo a neurotransmissão) e de outros neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina e glutamato (Heinrich *et. al.*, 2004). A sua actividade e permanência na fenda sináptica são reguladas pela hidrólise catalisada pelo enzima acetilcolinesterase (AChE), em colina e num grupo acilo (Grifth R *et. al.*, 2000).

2.1 - Inflamação e Stress oxidativo na Doença de Alzheimer

Várias linhas de investigação sugerem que a DA tem origem num processo inflamatório do cérebro. Pensa-se que a inflamação seja induzida por patologias relacionadas com o sistema nervoso central (SNC). Destas patologias, destacam-se a formação de placas senis (β -amilóide) no cérebro de pacientes, a hiperfosforilação da proteína tau, as quais se agregam nos neurónios formando microfibrilhas entrançadas ou componentes da degeneração das microfibrilhas (Stuchbury e Münch, 2005).

As células da microglia constituem 10% das células do SNC, tendo como principal função a defesa do mesmo após invasão por agentes patogénicos. São como um sensor especializado para os tecidos danificados do cérebro, representando o sistema imunitário inato.

Em situações patológicas estas células tornam-se activas e migram para o meio onde existam células danificadas, fagocitando-as (Heneka *et. al.*, 2007) e também podem regular a quantidade de placas senis depositadas nos neurónios.

Evidências mais recentes sugerem que em condições de stress provocado pela formação e acumulação de proteína A β , bem como, a fosforilação da proteína tau conduzem à activação das microglias. Deste modo, activa-se a formação de uma grande quantidade de mediadores de detecção pró-inflamatórios, de citocinas, de α -interleucina (IL), de proteína C reactiva (PCR), incluindo o factor de necrose tumoral (TNF- α). O aumento da PCR e de citocinas pode ser activada pela via autócrina ou parácrina, estimulando as células da glia a produzir o péptido β -amilóide e emaranhados neurobrilares. Este ciclo pode ser estabilizado por mediadores inflamatórios, exercendo um papel importante na estimulação e activação de moléculas patológicas conduzindo à neurodegeneração (Chong *et. al.*, 2008).

Muitas linhas de estudo evidenciam que as placas senis estão associadas aos astrócitos que funcionam como barreira protectora entre os depósitos de β -amilóide e os neurónios. Os astrócitos activos podem activar as células da glia e, consequentemente, promover a produção de substâncias pró-inflamatórias (*e.g.*, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PCR) na fase inicial do processo inflamatório, as quais podem, posteriormente, estimular a síntese de proteína A β e a fosforilação da proteína tau, as quais, por sua vez, estimulam as células da glia na produção de substâncias pró-inflamatórias estabelecendo-se um ciclo (Kamer *et. al.*, 2008; Chauhan, 2006).

Os astrócitos também são importantes para a fagocitose, remoção e degradação de A β , para o suporte trófico neuronal e para formar uma barreira protectora entre depósitos de A β e neurónios. No entanto, em condições de stress oxidativo, o papel dos astrócitos pode não ser benéfico. Estes quando se tornam reactivos acumulam-se em sítios de placas de A β , muito provavelmente, prolongando a neuroinflamação e contribuindo para a neurotoxicidade mediada pelo óxido nítrico, ao expressar os enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e argininossuccinato sintase. Estudos recentes sugerem que os astrócitos podem ser também uma fonte de A β , visto que

em condições de stress oxidativo eles podem expressar enzimas que catalisam a sua formação. O cérebro é um órgão muito vulnerável ao stress oxidativo devido a factores relacionados com: a) presença de muitas vias metabólicas associadas à glucose; b) baixo nível de enzimas antioxidantes; c) presença de concentração elevada de ácidos gordos polinsaturados que podem ser potenciais substratos para a peroxidação lípidica; d) presença de metais de transição activadores de enzimas que podem catalisar a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Contudo, tem sido demonstrado que a presença de ROS é o principal indutor do stress oxidativo associado a várias doenças neurológicas (Chauhan *et. al.*, 2006).

O potencial indutor de stress oxidativo no cérebro na doença de Alzheimer é o péptido β -amilóide. Vários processos oxidativos estão associados a este péptido, os quais são induzidos por interacção directa ou pela agregação das membranas dos neurónios, pela interacção com outras ROS incluindo o óxido nítrico, através da autoradicalização do péptido β -amilóide.

Foi encontrado um mecanismo adicional que contribui para a toxicidade de β -amilóide incluindo actividade redox, homeostasia iónica e hiperfosforilação dos microtúbulos associados à proteína tau e filamentos helicoidais (Behl, 1997).

ácido lipóico e β -caroteno demonstraram ser eficazes no combate ao stress oxidativo e protecção dos neurónios após toxicidade (Bjelakovic *et. al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos naturais das plantas vasculares superiores. Estes compostos têm sido reconhecidos na actividade hepatotóxica, anti-inflamatória, anti-alergénica, anti-osteoporótica, anticarcinogénica, nas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Vários estudos feitos clarificam a acção dos flavonóides como agentes antioxidantes e está assente que o mecanismo de acção tem por base a modulação de sinal das vias intracelulares importantes para a função celular. A sua baixa toxicidade e elevada acessibilidade tem demonstrado ser o caminho mais favorável na obtenção de compostos biologicamente activos para prevenir e tratar danos causados pelo stress (Gomes *et. al.*, 2008).

2.2-Acetilcolinesterase como alvo terapêutico na doença de Alzheimer

A acetilcolinesterase é um enzima cuja estrutura tridimensional revela um centro activo localizado na base de uma cavidade com cerca de 20 Å de profundidade (Figura 14). O centro activo é composto por: a) uma tríade catalítica (Ser-200), (His-440), (Glu-327): b) bolso acilo (Phe 295, Phe 297); c) um local de ligação da acetilcolina (Trp 86, Glu 202 e Tyr 337), e um d) local de ligação periférica (Trp 286, Tyr 72, Tyr 124 e Asp74) (Abou-Donia, 2003).

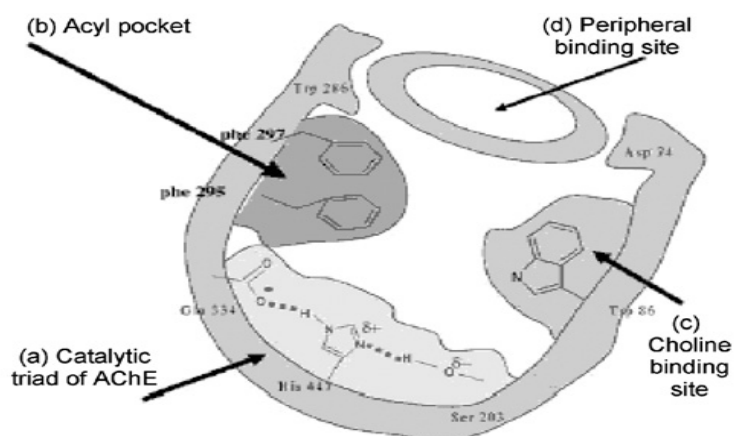


Figura 14 – Cavidade do centro activo da acetilcolinesterase de mamíferos (Abou – Donia 2003).

O mecanismo de hidrólise da acetilcolina envolve o ataque ao grupo hidroxilo do resíduo de serina da tríade catalítica gerando o intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogénio, ao qual resulta num resíduo de colina livre e em serina acetilada. A serina sofre uma hidrólise, recuperando o centro catalítico do enzima (Abou-Donia, 2003).

O processo inflamatório e a formação de placas senis (β -amilóide) é muito complexo envolvendo estudos muito detalhados e minuciosos na obtenção de fármacos que possam se utilizados no tratamento profiláctico ou mesmo terapêutico.

Têm sido utilizadas várias estratégias terapêuticas tais como a utilização de compostos que modulam actividade da γ -secretase enzima interveniente na formação de A β , inibindo a sua acumulação em placas amilóides formação (Stuchbury e Münch, 2005) e administração de compostos inibidores da acetilcolinesterase e de compostos antioxidantes.

A hipótese de utilização de inibidores da acetilcolinesterase tem sido bem sucedida e aplicada no tratamento profilático e terapêutico da DA, verificando-se assim uma grande melhoria de vida dos pacientes. Alguns inibidores químicos como os compostos organofosfatos e carbamatos são inibidores irreversíveis ligam-se ao enzima por ligações covalentes ou iónicas e, por isso, apresentam um grau de toxicidade muito elevado (Abou-Donia, 2003).

A procura de substâncias com um grau de toxicidade baixo, tem-se intensificado cada vez mais, investigando-se plantas utilizadas na medicina tradicional, como fonte de obtenção de compostos inibidores da AChE, (Ingkanian *et. al.*, 2003; Dinamarca *et. al.*, 2007; Ferreira *et. al.*, 2006; Mukherjee *et. al.*, 2008).

Estes inibidores de origem vegetal ligam-se ao enzima da uma forma reversível por ligações fracas intermoleculares, permitindo, deste modo, a recuperação do centro activo do enzima.

Um dos compostos recentemente aprovado, de origem vegetal, é a galantamina extraída da espécie *Gallanthus* (família Amarilidaceae) e que é utilizada no tratamento da DA, uma vez que se constata uma grande melhoria de vida para os pacientes (Heinrich *et. al.*, 2004).

Neste trabalho, foram estudadas algumas plantas que tradicionalmente são usadas em doenças como a perda de memória, insónia e depressão. Extractos de outras plantas apresentam uma elevada actividade inibidora da AChE e actividade antioxidante relevante para o tratamento da DA. Outras foram escolhidas aleatoriamente. (Lin *et. al.*, 2008; Ingkanian *et. al.*, 2003).

II – MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material Vegetal

Para a realização deste trabalho foram utilizados extractos de plantas obtidas no supermercado, Museu da Cidade de Lisboa e colhidas em Angola.

As plantas usadas foram: *Zea mays* (barba de milho) - parte usada estigma; *Citrus sinensis* (Flor de laranjeira) – flor; *Petrospartum tridentatum* (Carqueja) - flor; *Aquisentatum arvense* (Cavalinha) – parte aérea; *Menta x piperita* (Hortelã-pimenta) – parte aérea e *Tabebuia avellanedea* (Pau de Arco) - casca do tronco e *Petroselinum crispum* (salsa hortense) - folhas, obtidas do supermercado; *Persea americana* (Abacateiro)- folhas - colhidas no Museu da Cidade de Lisboa.

As plantas seguintes foram compradas na ervaária em Luanda: N'dembi – parte aérea, *Eucalyptus/Pinus* - folhas e *Ginkgo Biloba* - folhas.

2.2. - Reagentes Químicos

Todos os reagentes químicos usados para este trabalho tinham o maior grau de pureza disponível e foram usados tal como fornecidos. Os reagentes químicos utilizados foram: acetilcolinesterase (AChE) tipo VI-S extraída da enguia eléctrica 349 U/mg sólido, 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH), 5,5-ditiobis [2-nitrobenzeno] (DTNB), iodeto de acetilcolina (AChI), ácido rosmarínico, ácido clorogénico pancreatina, rutina, polietilenoglicol, reagente de Folin-Ciocalteu, metanol-HPLC, acetonitrilo (Sigma). Tris[hidroximetil]aminometano (tampão Tris), pirogalol, dihidrogenofosfato de potássio, ácido ortofosfórico, carbonato de sódio, pepsina 0,53 U/mg, ácido acético, cloreto de sódio (Merck). Cloreto de magnésio hexahidratado, ácido clorídrico (Riedel-de-Haën). A água utilizada em HPLC foi água milliQ.

2.3. – Equipamentos

Para os ensaios de actividade antioxidante, fenóis totais e actividade da acetilcolinaesterase foram feitos espectros na região UV-Visível, os quais foram efectuados num espectrofotómetro Shimadzu UV1603. A análise de HPLC (*High Precision Liquid Cromatography*) foi efectuada num Finnigan™ Gold e Sorveyor® PlusModular LC System equipado com coluna Purospher® star RP-18 da Merck e Software Xcalibur. Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa Apex Ultra FTICR da Bruker Daltonics equipado com um magneto supercondutor, com fonte de ionização por electrospray (ESI) e uma bomba de infusão da KD Scientific. Os extractos secos foram liofilizados num liofilizador Heto-power Dry LL3000. O suco pancreático foi centrifugado numa centrífuga *mini Spin* da Eppendorf.

2.4. - Preparação de Extractos

Os extractos de plantas foram preparados a partir de infusões. Usou-se 10 g de material fresco ou seco triturado e deixado em infusão durante 15 min em 100 mL de água destilada fervida. Estes foram arrefecidos à temperatura ambiente durante cerca de 20 min e, de seguida, filtrados em vácuo e, posteriormente, por acção da gravidade. As infusões foram, então, colocadas a liofilizar, por um período máximo de 3 dias; após, o que foi determinado o peso seco de cada extracto.

2.5. - Inibição da actividade da Aceticolinesterase

A actividade enzimática do acetilcolinesterase foi determinada através de uma adaptação do método descrito por Ingkanian *et. al.*, 2003. Neste ensaio, a acetilcolina é usada como substrato para a AChE, originando acetado e tiocolina. Da reacção da tiocolina com o DTNB resulta 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o ião 5-tio-2-nitobenzoato que tem um máximo de absorvência a 405 nm (Figura 15).

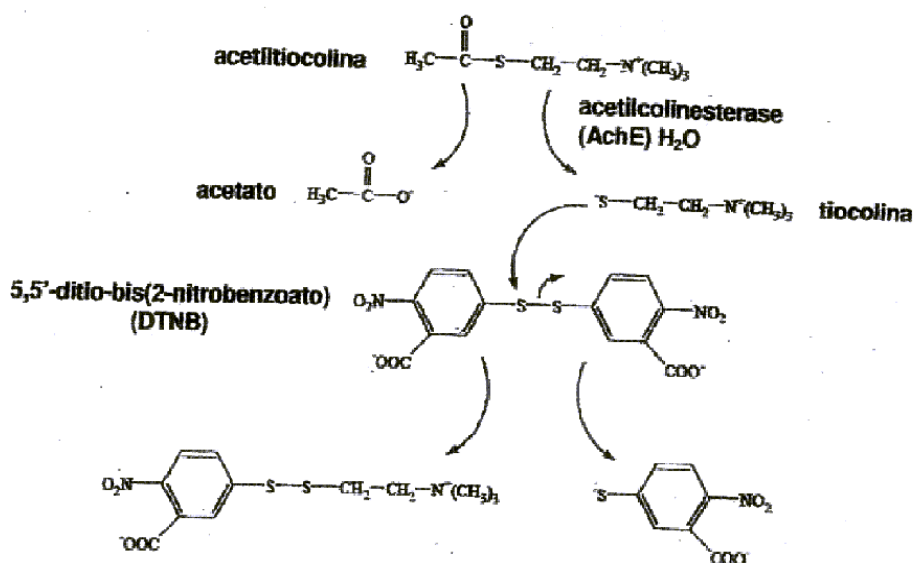


Figura 15- Esquema reaccional no qual se baseia a quantificação da actividade enzimática da acetilcolinesterase,(produto final TNB) (Adaptado de Frasco *et. al.*, 2005).

Numa *cuvete* juntou-se 325 μL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, 100 μL de amostra, 25 μL de solução de acetilcolinesterase contendo 0,26 U/mL. Após 15 min de incubação, juntou-se 75 μL de AchI e 475 μL de DTNB 3 mM. Numa segunda *cuvete* preparou-se o branco, onde se usou a água destilada em vez de extracto.

2.6. - Actividade antioxidante pelo DPPH

Para este ensaio utilizou-se o método clássico do DPPH, que se baseia na capacidade dos compostos antioxidantes em extinguir radicais livres, neste caso, o radical DPPH (Tepe *et. al.*, 2007). Adicionou-se 25 μL de solução de extractos a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,02%). A mistura foi a incubar durante 30 min com agitação a cada 5 min, mediu-se, em seguida, a absorvência a 517 nm, contra o branco correspondente (metanol). O ensaio foi realizado em várias concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL) e em triplicado para cada uma das soluções.

A percentagem de extinção do DPPH foi calculada utilizando a fórmula seguinte:

$$E (\%) = [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controlo}}] \times 100,$$

onde A_{controlo} é a absorvência do branco (reacção controlo na qual se usou água destilada e DPPH); A_{amostra} é a absorvência da reacção com determinada concentração de extracto e DPPH. A concentração de extracto cuja extinção pelo DPPH é de 50% foi obtida através da regressão linear obtida pela representação gráfica da extinção do DPPH *versus* a concentração de extracto.

2.7. - Quantificação dos Fenóis Totais

Quantificação dos fenóis totais foi determinada usando a reagente de Folin-Ciocalteu (Oktay *et. al.*, 2003). Usou-se o reagente de Folin-Ciocalteu e o pirogalol como composto fenólico padrão. A 4,5 mL de água destilada foram adicionados 100 μ L de solução de extractos com concentração conhecida (1mg/mL) e 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se a solução e incubou-se durante 3 min a temperatura ambiente, juntou-se 300 μ L de solução de carbonato de sódio a 2% (m/v), incubou-se durante 2 h com agitação intermitente de 15 em 15 min e a absorvência foi medida a 760 nm. Para o branco usou-se água destilada em vez de reagente de Folin-Ciocalteu. O ensaio foi realizado em triplicado para cada extracto. O conteúdo em fenóis totais foi calculado através da recta de calibração realizada com o padrão pirogalol e os resultados expressos em em microgramas de equivalentes de pirogalol por miligrama de peso seco de extracto.

2.8 - Cromatografia líquida de alta precisão em fase reversa HPLC-RP-DAD

Para a análise dos extractos por HPLC foi realizado um gradiente de eluição tal como se descreve a seguir: solução A – acetonitrilo, solução B - Metanol e Solução C - composta por água/ácido fosfórico.

O gradiente foi constituído de acordo com a tabela abaixo descrita. O volume de injeção foi de 25 µL e fluxo de 1,0 mL/min. Neste procedimento preparou-se uma solução de extracto 0.5 mg/mL

Tabela 1-Gradiente de eluição usado na identificação dos compostos dos extractos

Tempo (min)	Solução A (ACH ₃ CN)%	Solução B (MeOH)%	Solução C (0,3% H ₃ PO ₄)%
0	5	5	90
40	30	30	40
60	49	49	2
65	5	5	90

2.9 – Espectrometria de massa

Recolheram-se fracções (utilizando o gradiente descrito no ponto 2.8) de aproximadamente 2 mL correspondentes aos máximos de absorvência maioritários para o extracto de *ginkgo biloba*, que foram analisadas por espectrometria de massa.

Esta análise foi realizada no espectrómetro Apex Ultra FTICR. A amostra foi introduzida por meio de uma bomba de infusão com uma velocidade de fluxo de

120 µL/h. O espectrómetro foi calibrado com uma solução de polietilenoglicol de concentração $2,8 \times 10^6$ mol/L diluída em metanol e acidificada com ácido acético (0,1%).

O espectro de massa foi adquirido no modo positivo. O fluxo do gás nebulizador foi de 2,5 L/min, a velocidade do gás de secagem foi de 4,0 L/min. O gás usado foi o azoto e obteve-se espectro MS².

2.10 - Degradação enzimática dos extractos por suco gástrico artificial

Para o estudo da degradação enzimática dos extractos por suco gástrico utilizou-se o método descrito por Yamamoto *et. al.*, 1999. A 2,5 mL de solução de suco gástrico adicionou-se 2,5 mL de solução de extracto 10 mg/mL, agitou-se e recolheu-se 100 µL da mistura e transferiu-se para um tubo contendo 900 µL de metanol colocou-se o tubo num recipiente com gelo. A mistura reaccional foi colocada num banho termostatzado a 37° C, de 60 em 60 min (durante 4 h) recolheu-se 100 µL mistura para o tubo contendo 900 µL de metanol e levou-se analisar em HPLC, usando-se o gradiente descrito no ponto 2.8. O tempo zero foi considerado para a alíquota retirada antes de colocar a mistura no banho termostatzado. A solução de suco gástrico consiste em 80 mg de pepsina, 50 mg de NaCl diluída em 25 mL de água destilada, com pH ajustado a 1,2 com HCl.

2.11 - Degradação enzimática dos Extractos por suco pancreático artificial

Para o estudo da degradação enzimática do extracto pelo suco pancreático utilizou-se o método descrito por Yamamoto *et. al.* (1999). Num tubo de ensaio contendo 2,5 mL da solução de pancreatina adicionou-se 2,5 mL de solução de extracto (10 mg/mL), agitou-se a mistura e retirou-se uma alíquota de 100 µL de amostra e transferiu-se para um tubo contendo 900 µL de metanol. A mistura reaccional foi colocada num banho termostatzado a 37° C de 60 em 60 min (durante 4 h) recolheu-se 100 µL mistura para o tubo contendo 900 µL de metanol, centrifugou-se durante 30 s a 13000 rpm e, de seguida, levou-se analisar em HPLC, usando-se o gradiente descrito no ponto 2.8. O

tempo zero foi considerado para a alíquota retirada antes de colocar a mistura no banho termostatizado. A solução de suco pancreático consistiu em 80 mg de pancreatina diluída em 25 mL de tampão de dihidrogenofosfato de potássio, com pH ajustado a 8,0 com HCl.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho estudaram-se algumas plantas que são utilizadas quer na forma de chá, quer como condimentos na culinária portuguesa. Estudaram-se também três plantas muito utilizadas em Angola, *Ginkgo biloba*, N'dembi e a mistura de eucalipto-pinheiro, para o tratamento de várias doenças. Para todas as plantas serão apresentados os nomes sistemáticos, excepto para N'dembi, uma vez que não se conseguiram espécimes em condições de uma classificação completa, no entanto sabe-se que pertence ao género *Lippia*. As aplicações para cada uma destas plantas são as descritas na Introdução. Os estudos, cujos resultados irão ser descritos e discutidos neste capítulo incidiram na obtenção de extractos aquosos na forma de infusões (3.1.) e a sua acção sobre o enzima acetilcolinesterase (3.2.), capacidade antioxidante (3.3.) e determinação de fenóis totais (3.4.). Fez-se, em seguida, uma análise integrada destes resultados de modo a tentar compreender a função dos fenóis nas actividades referidas (3.5.). No extracto que melhores resultados apresentou fizeram-se tentativas de identificação dos compostos maioritários utilizando a técnica de HPLC-RP-DAD (3.6.). Fez-se ainda a identificação por espectrometria de massa de um dos máximos de absorção do extracto de *Ginkgo biloba* (3.7.). Para o extracto de *Ginkgo biloba* fez-se, ainda, um estudo do metabolismo *in vitro* pelo tracto gastrointestinal utilizando sucos digestivos preparados no laboratório (3.8.).

3.1. Obtenção de extractos

Foram realizados extractos aquosos, conforme o procedimento descrito em 2.4., das onze plantas em estudo, cujos resultados em massa de extracto obtida por grama de planta utilizada se mostra tabela 2. Para a obtenção destas massas utilizou-se aproximadamente 10 gramas de planta fresca ou seca previamente trituradas. As plantas frescas foram as folhas abacateiro, salsa, e as restantes foram de compra e como tal vieram já secas nos respectivos pacotes.

Obtiveram-se maiores quantidades de extracto liofilizado para as plantas hortelã-pimenta e flor de laranjeira.

Tabela 2: Quantidade de extracto obtido por grama de planta utilizada (g extracto/10 g planta)

Nome sistemático	Nome comum	Parte usada	Massas (g)
<i>Citrus x sinensis</i>	Laranjeira	Flores	1,66
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cavalinha	Partes aéreas	1,36
<i>Eucaliptus glóbulus</i> L. / <i>Pinus pinaster</i> Ait	Eucalipto/ Pinheiro	Folhas	0,95
<i>Ginkgo biloba</i> L.	<i>Ginkgo biloba</i>	Folhas	1,14
<i>Menta x piperita</i> L.	Hortelã- pimenta	Partes aéreas	1,82
<i>Lippia</i>	N'dembi	Partes aéreas	0,76
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacateiro	Folhas	1,04
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Salsa	Parte aérea	0,56
<i>Pterospartum tridentatum</i> L.	Carqueja	Flores	1,36
<i>Tabebuia avellanedeae</i> Mill.	Pau de arco	Casca	0,39
<i>Zea mays</i> L.	Milho	Estigma	0,63

3.2. - Inibição da actividade da Acetilcolinesterase

Algumas plantas medicinais são tradicionalmente usadas no tratamento de doenças do foro psicológico e psiquiátrico. Sendo a DA uma das formas de demência mais preocupantes nas sociedades actuais, e, a inibição da actividade da acetilcolinesterase a abordagem mais comum no tratamento, analisou-se a capacidade inibitória do enzima AChE para diferentes concentrações de extracto de várias plantas medicinais obtidos por infusão. Na Figura 16 estão representados graficamente os valores da percentagem de inibição enzimática as diferentes concentrações de extractos.

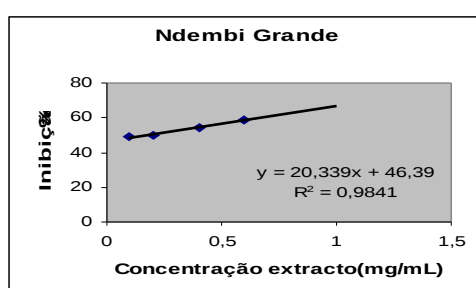
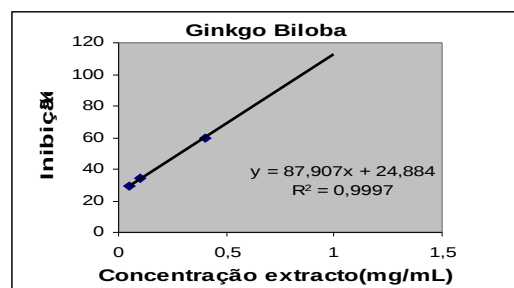
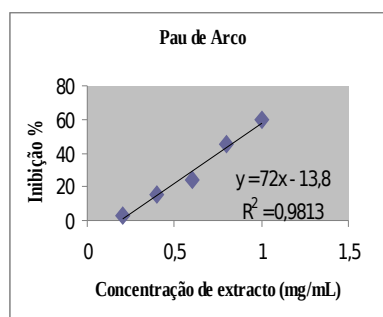
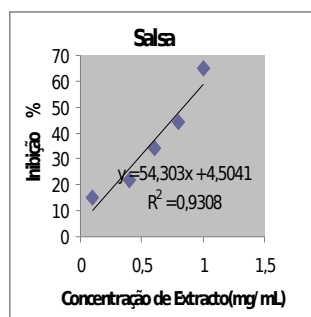
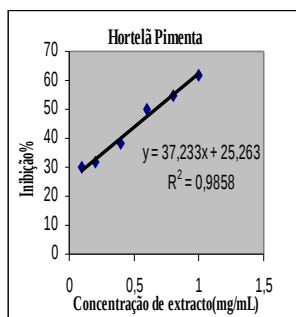
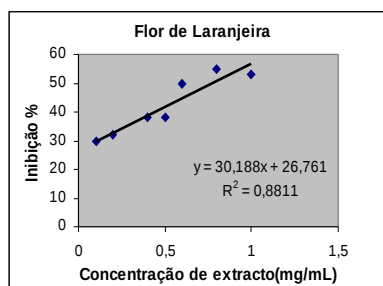
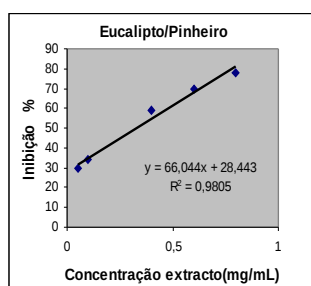
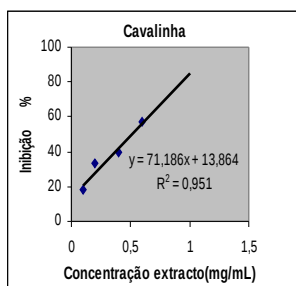
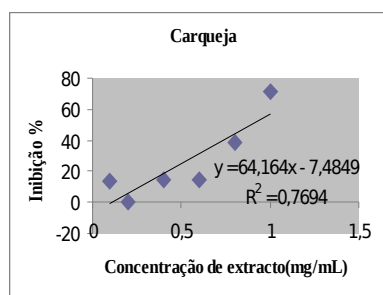
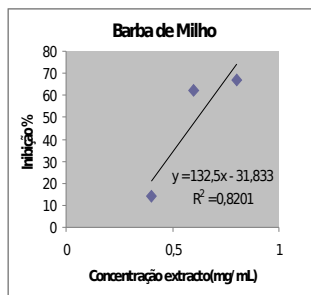
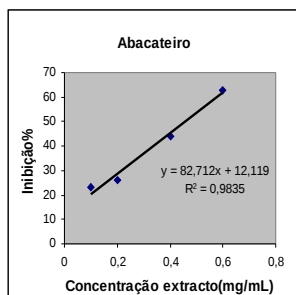


Figura 16. Representação gráfica da percentagem de inibição da actividade enzimática por diferentes extractos.

Através da regressão linear foi possível calcular a concentração que é necessária para inibir a actividade do enzima em 50%. Com base nas rectas obtidas calculou-se o valor do IC_{50} para os extractos, os resultados estão representados na tabela 3.

Tal como se verifica pelos valores apresentados na tabela 3 e pela representação gráfica, todos os extractos apresentam uma certa percentagem de inibição da actividade do enzima. Sendo estes valores da ordem dos 0,18 – 0,89 mg/mL.

Excepto para os extractos de barba de milho, carqueja e flor de laranjeira que apresentaram valores de R^2 que oscilaram entre 0,79 e 0,88, todos os outros extractos apresentaram boa correlação linear, uma vez que o R^2 foi superior a 0,93. Os extractos com maior actividade foram os de N'dembi ($IC_{50}=0,18\pm0,02$ mg/mL) e de *Ginkgo biloba* ($IC_{50} = 0,25\pm0,02$ mg/mL), seguidos da mistura de eucalipto e pinheiro com um IC_{50} de $0,33\pm0,01$ mg/mL. Estes valores são concordantes com os resultados obtidos por Mata *et. al.*, 2007. Foram obtidos resultados semelhantes aos da galantamina alcalóide, actualmente comercializado como inibidor da AChE e usado no tratamento da doença de Alzheimer (Heinrich e Teoh, 2004), cuja concentração é de 0,2 mg/mL inibindo a 100% a actividade da AChE (Orhan *et. al.*, 2007; Ingkanian *et. al.*, 2003).

Os valores de IC_{50} obtidos para os extractos aquosos são similares aos obtidos por Das Amitava *et. al.*, 2002, com extracto padronizado de *Ginkgo biloba*, 0,27 mg/mL com uma inibição de 50%. Estes resultados permitem concluir que extractos aquosos destas plantas possuem compostos químicos que podem ser potenciais inibidores da acetilcolinesterase.

Tabela 3. Valores de IC_{50} dos extractos aquosos em mg de extracto/mL.

Nome sistemático	Nome comum	Parte usada	IC_{50}
<i>Citrus x sinensis</i> L.	Laranjeira	Flores	$0,77\pm0,01$
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cavalinha	Parte aérea	$0,51\pm0,03$
<i>Eucaliptus glóbulus</i> L./ <i>Pinus pinaster</i>	Eucalipto/	Folhas	$0,33\pm0,01$

Ait	Pinheiro		
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo biloba	Folhas	0,25±0,02
<i>Menta x piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	Parte aérea	0,68±0,03
<i>Lippia</i> sp	N'dembi	Parte aérea	0,18±0,02
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacateiro	Folhas	0,45±0,02
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Salsa	Parte aérea	0,83±0,02
<i>Pterospartum tridentatum</i> L.	Carqueja	Flores	0,89±0,05
<i>Tabebuia avellanedeae</i> Mill.	Pau de arco	Casca	0,88±0,01
<i>Zea mays</i> L.	Milho	Estigma	0,62±0,03

3.3. - Actividade antioxidante pelo DPPH

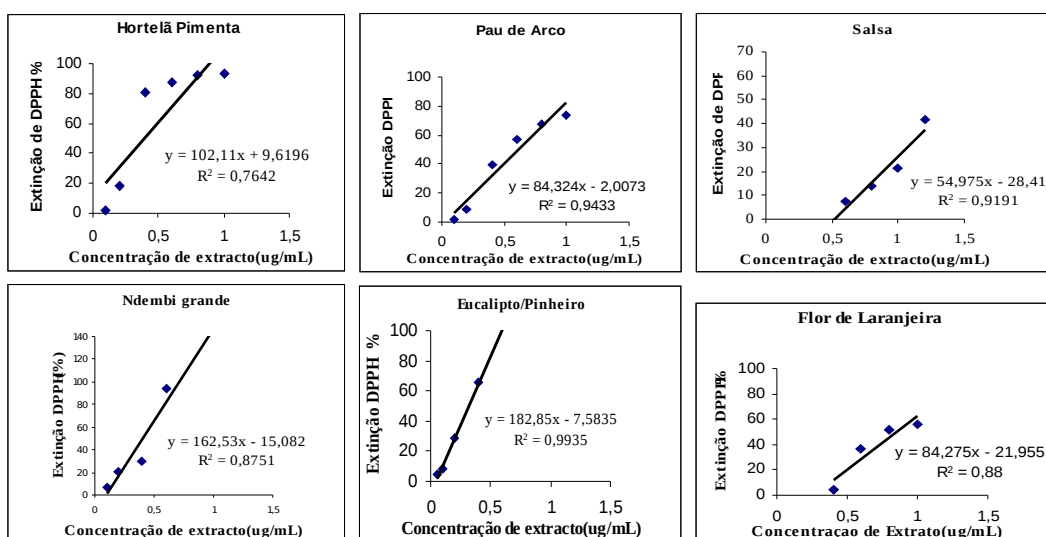
A actividade antioxidante é um processo muito complexo que ocorre através de diversos mecanismos. Uma vez que os extractos das plantas apresentam uma composição química complexa é necessário efectuar testes para a determinação destas propriedades antioxidantes (Auroma O, 2003). Para este trabalho usou-se o método tradicional do DPPH que se baseia na capacidade dos compostos antioxidantes de extinguir o radical livre 2,2-difenil-L-picrihidrazil (DPPH[•]) formado em solução ao doar um átomo de hidrogénio ou um electrão (Tepe *et. al.*, 2005).

Se o extracto tiver a capacidade de extinguir o radical livre, neste caso, o DPPH, a solução inicial de cor azul-púrpura torna-se incolor devido a formação do composto difenilpicrilhidrazina (Mata *et. al.*, 2007). Esta reacção foi comparada com a capacidade antioxidante do padrão hidroxitolueno butilado (BHT).

Para os extractos obtidos realizou-se o ensaio do DPPH a diferentes concentrações de extracto (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL), cujos resultados se mostram na Figura 17. Houve uma relação linear com correlação superior a 0,90 na maior parte dos extractos, excepto, para os extractos de *Citrus x sinensis* (flor de laranjeira), *Mentha piperita* (hortelã pimenta) e N'dembi, cujos valores oscilaram entre os 0,76 e 0,88. A partir dos gráficos foi possível determinar os valores de EC₅₀, cujos resultados se apresentam na tabela 4. Verificou-se que para concentrações mais baixas a extinção

do radical DPPH apresentava uma relação linear, com a concentração de extracto. Para concentrações mais elevadas observou-se a extinção do radical, tendo como indicador a passagem de cor da solução de púrpura para incolor, estabilizando a partir de certo valor de concentração. Esta estabilidade ocorre devido a extinção total do radical DPPH.

Pelos resultados obtidos verifica-se que todos os extractos possuem capacidade de extinção do DPPH. O melhor resultado foi obtido para o extracto de *Ginkgo biloba* $2,6 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$. A mistura Eucalipto/Pinus (eucalipto/pinheiro), *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) e *Pterospartum tridentatum* (carqueja) apresentam valores da ordem dos 3,0-4,4 $\mu\text{g/mL}$. Para os extractos de *Equisentum arvense* (cavalinha) e *Tabebuia avellanedae* (pau de arco) estes valores rodam os 5,0-8,9 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados são da mesma ordem de grandeza dos valores obtidos por Mata *et. al.*, 2007 para extractos aquosos de *Mentha pulegium* com EC_{50} $8,9 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ e *Mentha spicata* com EC_{50} $5,7 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$. Para o extracto de *Petroselinum crispum* (salsa) o valor de obtido é de EC_{50} $=14,03 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$, valor este aproximado ao do padrão BHT com EC_{50} $=15,17 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ (Mata *et. al.*, 2007), Embora os restantes valores de EC_{50} sejam inferiores ao do padrão BHT e aos obtidos por Mata *et. al.*, 2007, verifica-se uma certa capacidade destes extractos em extinguir o radical DPPH, possuindo, portanto, propriedades antioxidantes.



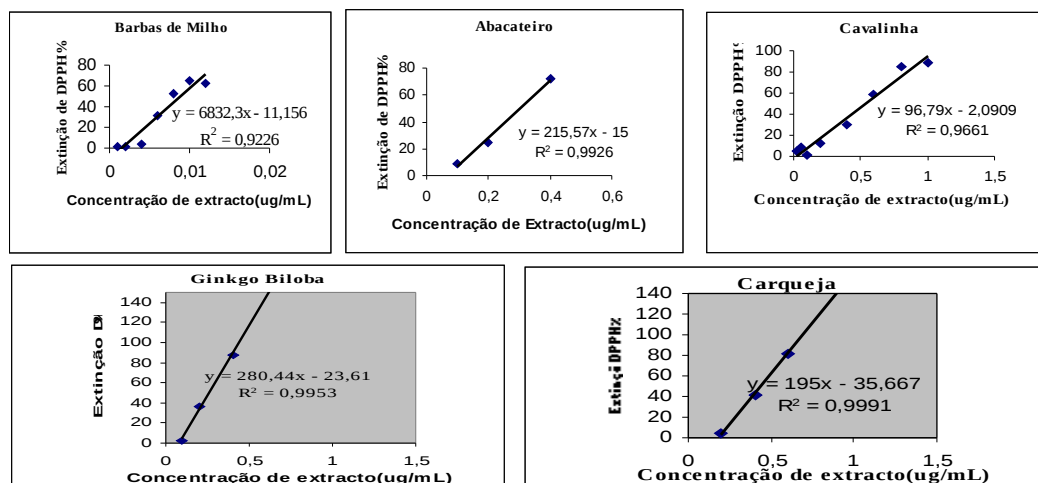


Figura 17. Representação gráfica da extinção de DPPH vs concentração de extracto.

Tabela 4. Valores da percentagem de Extinção do DPPH (EC₅₀) dos extractos aquosos.

Nome sistemático	Nome comum	Parte usada	EC ₅₀ (µg/mL)
<i>Citrus x sinensis</i> L.	Laranjeira	Flores	8,5±0,9
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cavalinha	Parte aérea	5,4±0,3
<i>Eucaliptus glóbulus</i> L. / <i>Pinus pinaster</i> Ait.	Eucalipto/ Pinheiro	Folhas	3,1±0,1
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo biloba	Folhas	2,6±0,3
<i>Menta x piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	Parte aérea	4,1±0,4
<i>Lippia</i> sp.	N'dembi	Parte aérea	4,0±0,2
<i>Persea americana</i> , Mill.	Abacateiro	Folhas	3,0±0,3
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Salsa	Parte aérea	14,3±0,3
<i>Pterospartum tridentatum</i> L.	Carqueja	Flores	4,4± 0,5
<i>Tabebuia avellanedae</i> Mill.	Pau de arco	Casca	6,2±0,7
<i>Zea mays</i> L.	Milho	Estigma	8,9±0,7

3.4 - Quantificação de Fenóis totais

A quantificação dos fenóis totais nos extractos aquosos das plantas foi efectuado usando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, sendo os resultados expressos em µg de equivalentes de pirogallol por mg de extracto seco (Oktay *et. al.*, 2003). Traçou-se uma curva de calibração para o pirogallol (Figura18) e através do método de regressão linear, calculou-se a quantidade de fenóis totais existentes na concentração de 1,0 mg/mL de extracto. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

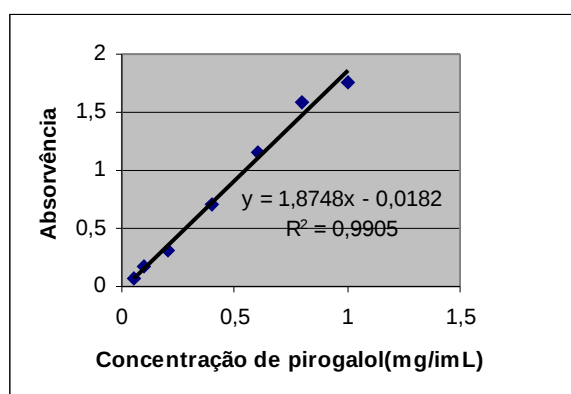


Figura 18- Curva de Calibração do Pirogalol

Tabela 5 - Valores de fenóis totais em µg de equivalente de pirogalol/mg de extracto.

Nome sistemático	Nome comum	Parte usada	(µg eqv.pirogalol/mg extracto)
<i>Citrus x sinensis</i> L.	Laranjeira	Flores	46,5±6,5
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cavalinha	Parte aérea	68,0±7,0
<i>Eucaliptus glóbulus</i> L. / <i>Pinus pinaster</i> Ait	Eucalipto/ Pinheiro	Folhas	153,0±8,0
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo biloba	Folhas	315,0±10,0
<i>Mentha x piperita</i> L.	Hortelã- pimenta	Parte aérea	233,5±1,5
<i>Lippia</i> sp.	N'dembi	Partes aérea	192,5±3,0
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacateiro	Folhas	50,0±8,0
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Salsa	Parte aérea	34,0±1,0
<i>Pterospartum tridentatum</i> L.	Carqueja	Flores	307,5±24,5
<i>Tabebuia avellanedeae</i> Mill.	Pau de arco	Casca	114,5±1,5
<i>Zea mays</i> L.	Milho	Estigma	92,0±6,5

Estes resultados demonstram a presença de fenóis nos extractos aquosos das plantas estudadas. De um modo geral, os valores da quantidade de fenóis totais variam entre 34 - 315 µg equivalentes de pirogalol/mg de extracto.

O extracto de *Ginkgo biloba* apresenta o maior valor de equivalentes de pirogalol, 315±10 µg/mg, seguido do de *Pterospartum tridentatum* (carqueja) com o valor de 307,0±24,5 µg/mg, valores semelhantes encontrados por Kumaran *et. al.*, 2007 nos seus estudos com extractos de várias plantas. O valor mais baixo foi encontrado para o *Petroselinum crispum* (salsa) 34±1,0 µg/mg. Estes resultados são da mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos por Mata *et. al.*, 2007 para os extractos etanólicos de plantas por eles estudados.

3.5. - Análise integrada dos resultados

Na tabela 6 apresentam-se os valores de IC₅₀ de inibição de AChE e de EC₅₀ referentes à extinção do DPPH, por ordem crescente da primeira actividade referida, bem como a correspondente quantidade de fenóis existentes em cada extracto. Pode-se verificar que não existe qualquer relação entre a actividade inibitória do enzima e a quantidade de fenóis existente nos extractos. Mais do que a quantidade de fenóis, o tipo de composto será mais importante para o caso da inibição do enzima, pois uma molécula ou outra diferente poderá não possibilitar o encaixe no centro activo do enzima de modo a impedirem a sua actividade.

Tabela 6 – IC₅₀ e EC₅₀ por ordem crescente da primeira actividade

Nome sistemático	Nome comum	IC ₅₀	EC ₅₀	Fenóis
<i>Pterospartum tridentatum</i> L.	Carqueja	0,89±0,01	4,4±0,5	34,0±1,0
<i>Tabebuia avellanedeae</i> Mill.	Pau de arco	0,88±0,01	6,2±0,7	114,5±1,5
<i>Petroselinum crispum</i> L.	Salsa	0,83±0,02	14,3±0,3	307,5±24,5
<i>Citrus x sinensis</i> L.	Laranjeira	0,77±0,01	8,5±0,9	46,5±6,5
<i>Zea mays</i> L.	Milho	0,62±0,03	8,9±0,7	92,0±6,5
<i>Mentha x piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	0,68±0,03	4,1±0,4	233,5±1,5
<i>Equisetum arvense</i> L.	Cavalinha	0,51±0,03	5,4±0,3	68,0±7,0
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacateiro	0,45±0,02	3,0±0,3	50,0±8,0
<i>Eucaliptus glóbulus</i> L. / <i>Pinus pinaster</i> Ait	Eucalipto/ Pinheiro	0,33±0,01	3,1±0,1	153,0±8,0
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo biloba	0,26±0,02	2,6±0,3	315,0±10,0
<i>Lippia</i> sp.	N'dembi	0,18±0,02	4,0±0,2	192,5±3,0

No que respeita à actividade antioxidante, pode verificar-se, Figura 19, que existe uma tendência para que maior quantidade de fenóis signifique maior actividade antioxidante.

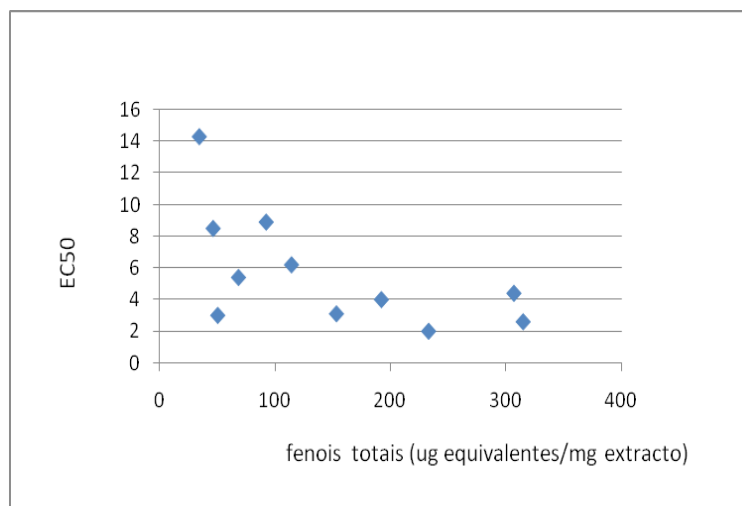


Figura 19 - Actividade antioxidante (DPPH) em função das quantidades de fenóis totais nos extractos.

3.6. - Análise dos extractos por HPLC-RP-DAD

A análise por HPLC-RP-DAD é uma das técnicas tradicionalmente usadas na separação e identificação de compostos complexos do metabolismo secundário das plantas (van Beek 2005; Krizman *et. al.*, 2007; Bilia *et. al.*, 2008).

Através da técnica de HPLC-RP-DAD analisaram-se os extractos das duas plantas que apresentaram melhor actividade enzimática, os da *Ginkgo biloba* e o de N'dembi. Os resultados estão representados na Figura 20 e tabela 7. Os cromatogramas obtidos apresentam valores máximos a tempos de retenção diferentes para ambos extractos.

Os extractos aquosos mostram máximos de absorvência maioritários com tempos de retenção (tr) de 17,31 min; 18,96 min; 21,62 min para a *Ginkgo biloba* e 15,86 min; 18,56 min; 19,45 min; 20,56 min; 26,86 min; 59,46 min para o N'Dembi.

Embora a *Ginkgo biloba*, seja uma planta complexa e amplamente estudada, com uma grande variedade de compostos químicos já identificados, estas identificações foram efectuadas para extractos etanólicos. Neste trabalho, em que se usam extractos aquosos, foi possível identificar três máximos de absorvência,

talvez este fenómeno se deva à fraca solubilidades dos compostos em água (Singh *et. al.*, 2008).

O extracto de N'dembi apresenta maior número de máximos de absorvência o que leva a concluir que possa existir nestes extractos aquosos uma grande variedade de compostos químicos complexos.

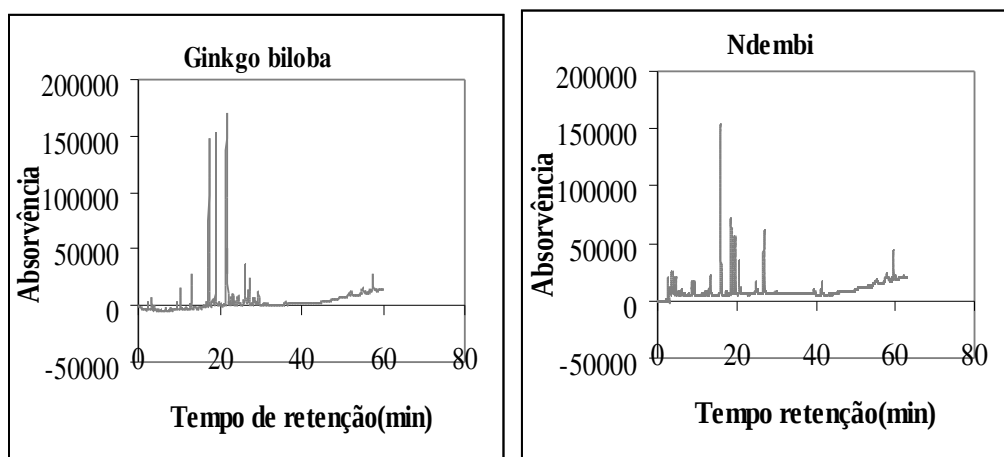


Figura 20 - Cromatograma da análise por HPLC do extracto de *Ginkgo biloba* e N'dembi.

Tabela 7 – Valores de retenção máximos e área obtidos por HPLC para os extractos de *Ginkgo biloba* e N'dembi.

Extracto	Tempo de Retenção (min)	Área (%)	Composto
<i>Ginkgo biloba</i>			
Pico 1	17,31	20,9	epigallocatequina
Pico 2	18,96	19,53	-
Pico 3	21,62	22,59	-
N'dembi			
Pico 1	15,86	29,81	-
Pico 2	18,56	14,36	-
Pico 3	19,45	10,31	ácido rosmarinico
Pico 4	20,56	5,71	-
Pico 5	26,86	12,74	rutina
Pico 6	59,45	2,57	-

Com o objectivo de identificar os compostos maioritários presentes nos extractos aquosos, destas plantas, foram traçados os espectros de UV para cada máximo de absorvência observado. Os resultados para o extracto de *Ginkgo biloba* encontram-se na Figura 21. Os espectros obtidos são característicos de flavonóides, uma vez que estes costumam exibir valores máximos de absorção entre 250 e 400 nm, que se encontraram nestes espectros. Os espectros das fracções com tempos de retenção de 18,96 e 21,46 são típicos dos compostos da família dos flavonóides com máximos de absorção da ordem dos 280 nm.

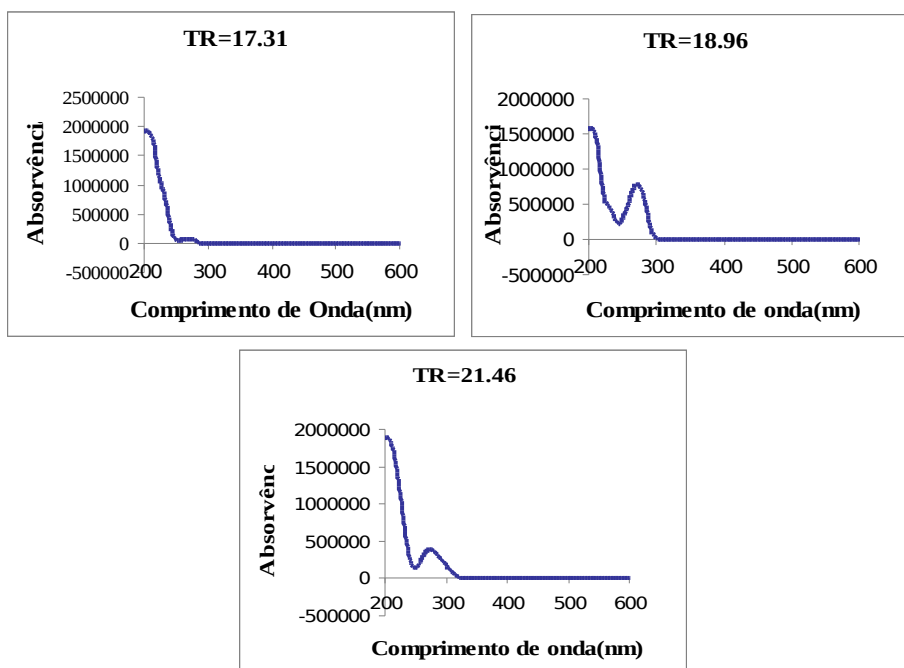


Figura 21 – Espectros de UV dos compostos de extractos de *Ginkgo biloba*, separados por HPLC-RP-DAD.

Para o extracto do N'dembi foram também traçados espectros de UV dos máximos principais com a intenção de se poder comparar com os compostos característicos, cujos resultados se mostram na Figura 22.

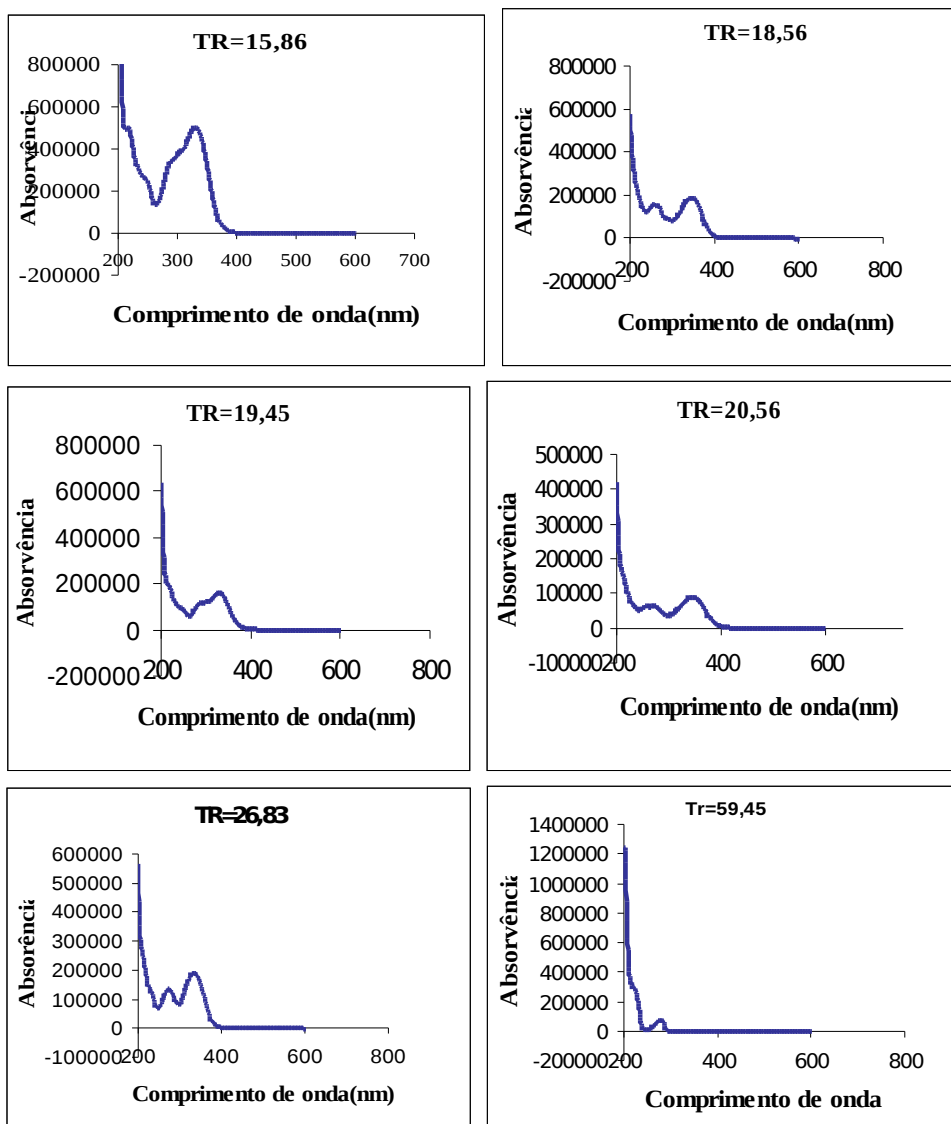


Figura 22 – Espectros de UV dos compostos do extracto de N'dembi detectados por HPLC. Os tempos de retenção (TR) dos compostos são expressos em min. O comprimento de onda é expresso em nm.

Os espectros obtidos para os compostos com tempos de retenção 15,8 e 19,4 minutos sugerem a presença de compostos derivados do ácido cafeíco. Fizeram-se espectros de padrões dos seguintes compostos: ácido cafeíco, rosmarínico e clorogénico, após passagem por HPLC-RP-DAD no mesmo sistema de gradiente. Comparando os espectros dos padrões, Figura 23, com os espectros dos cromatogramas do extracto N'dembi verifica-se que estes são típicos de compostos derivados de ácido cafeíco.

O composto com tempo de retenção 19,45 minutos, para além de apresentar um espectro idêntico ao do ácido rosmarínico tem também um tempo de retenção igual ao daquele padrão, o que leva a concluir tratar-se de ácido rosmarínico.

O composto com tempo de retenção 26,83 minutos tem um espectro semelhante ao da rutina, Figura 23-c, que apresenta, no mesmo eluente, um tempo de retenção semelhante ao obtido para o extracto.

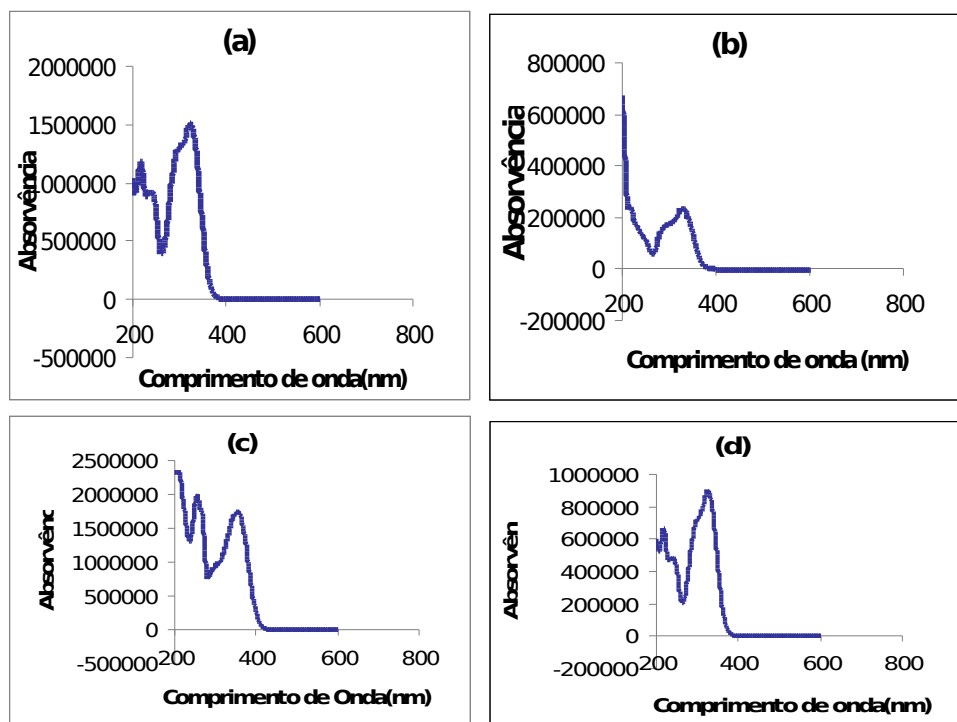


Figura 23 – Espectros de UV dos padrões: (a)-ácido cafeico; (b) ácido rosmarínico; (c)- rutina; (d) ácido clorogénico

Da bibliografia (Bilia *et. al.*, 2008) sabe-se que em plantas do género *Lippia*, como a *Lippia citriodora* existem compostos derivados do ácido rosmarínico e com estrutura semelhante à rutina. Como N'dembi pertence ao mesmo género e como tanto os tempos de retenção como os espectros de UV foram coincidentes entre a amostra e o padrão o ácido rosmarínico é o composto com tempo de retenção 19,45 minutos. A presença do ácido rosmarinico poderá comprovar a actividade inibidora encontrada, uma vez que pelos estudos feitos no mesmo laboratório comprovou-se que este composto possui actividade inibidora para AChE (Falé *et. al*, 2008).

3.7- Identificação dos compostos isolados por espectrometria de massa.

Uma vez que a maior parte dos estudos feitos com a *Ginkgo biloba* são em extractos etanólicos, não tendo sido encontrados resultados de trabalhos feitos com infusões, tentou-se identificar pelo menos um dos componentes do extracto aquoso, pois que os espectros de UV obtidos por HPLC-RP-DAD não eram coincidentes com os dos padrões disponíveis no laboratório, nem com os tempos de retenção obtidos.

Recolheram-se fracções do eluente, para servir como “branco” e do extracto correspondente aos vários tempos de retenção dos máximos de absorvência do extracto de *Ginkgo biloba* para serem analisados por espectrometria de massa. Na Figura 24 está representado o espectro de massa da fracção obtida para o máximo com tempo de retenção 17,31 minutos.

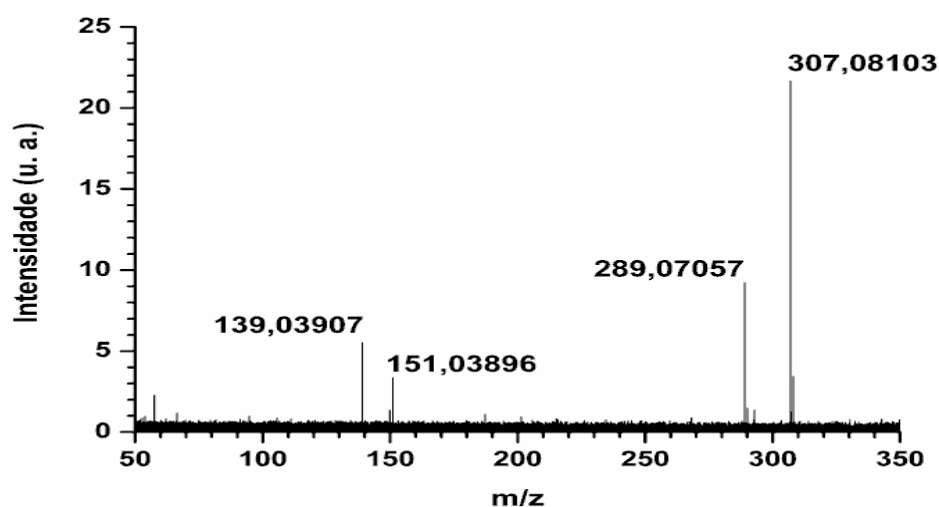


Figura 23- Espectro de massa MS^2 do ião com $m/z=307$, obtido em modo de ionização positivo para a primeira fracção ($tr=17,31$ min).

O espectro obtido corresponde a um ião cuja razão massa carga (m/z) é de 307,08, o qual é identificado como sendo um derivado da catequina. Este ião foi fragmentado obtendo-se dois iões com m/z de 151 e 139 cujas estruturas estão representadas na Figura 24 e tabela 7.

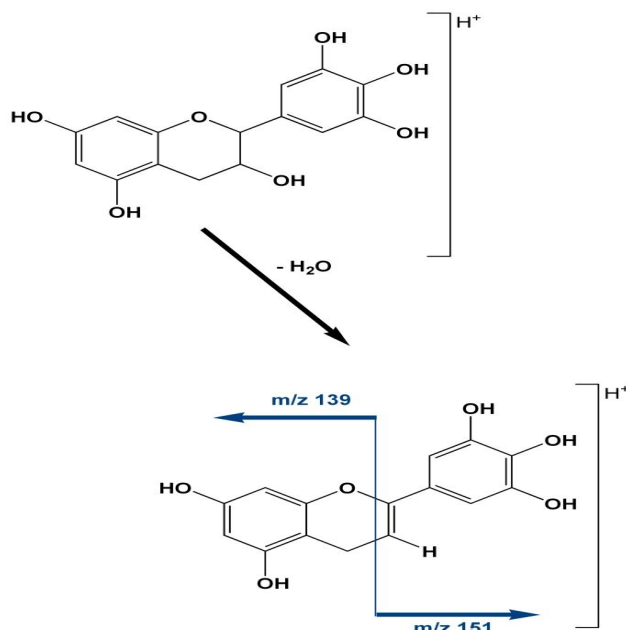


Figura 24- Fragmentação do ião de m/z 307,08.

Tabela 7- Razão carga massa (m/z) experimental e teórico do composto identificado.

Atribuição		m/z experimental	m/z teórico	Erro/ppm
$[C_{15}H_{15}O_7]^+$	$[M+H]^+$	307,08	307,08	0,6
$[C_{15}H_{13}O_6]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	289,07	289,07	0,3
$[C_8H_7O_3]^+$	$[M+H-H_2O-C_7H_6O_3]^+$	151,04	151,04	0,2
$[C_7H_7O_3]^+$	$[M+H-H_2O-C_8H_6O_3]^+$	139,04	139,04	-0,7

O composto com m/z de 307,08 é identificado como sendo a epigallocatequina cuja estrutura química está representada na Figura 25. Da bibliografia confirma-se a existência deste composto nos extractos da *Ginkgo biloba* (Singh *et. al.*, 2008). Estes compostos também foram identificados em extractos de *Camélia sinensis* e *Acacia catechu* (Miketova *et. al.*, 1998; Shen *et. al.*, 2006). Não foi possível identificar os compostos com tempo de retenção de 18,96 min e 21,46 min. Como a diferença mpostos pertencem à mesma família.

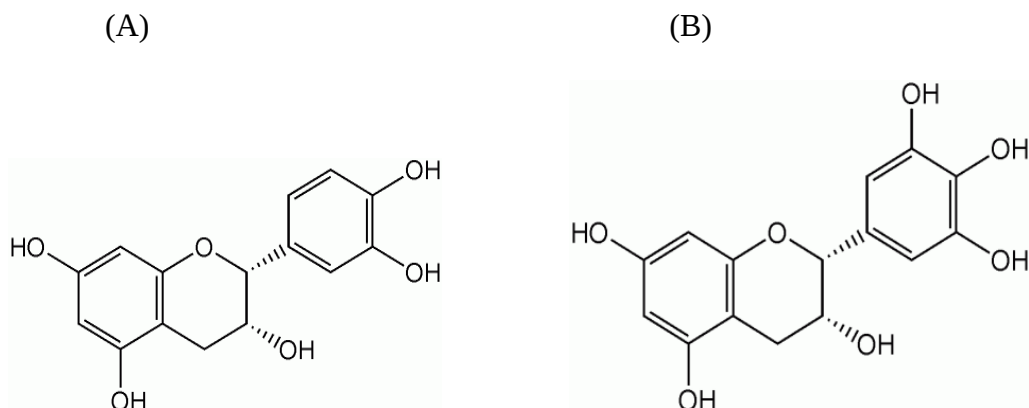


Figura 25- Estrutura da catequina (A) e epigallocatequina (B)

3.8. Degradação enzimática do extracto de *Ginkgo biloba*

Numa tentativa de se compreender o que poderá ocorrer no processo digestivo após o consumo de um chá de *Ginkgo biloba*, estudou-se a degradação deste extracto pelos enzimas do tracto gastrointestinal em sucos digestivos que pretendem simular o processo *in vitro*.

A absorção gastrointestinal dos compostos do metabolismo secundário dos extractos ocorre após digestão através de uma hidrólise extensiva destes compostos no tracto digestivo. Thomas Walle ,(2004) demonstrou que compostos como os flavonóides, podem ser hidrolisados na cavidade oral por glucosidades derivadas de bactérias ou do epitélio, sendo o intestino delgado o órgão principal na absorção dos compostos químicos presentes nos extractos de plantas, tais como flavonóides. Até chegar ao intestino delgado os compostos sofrem a acção de suco gástrico e digestivo.

3.8.1 - Degradação enzimática do extracto de *Ginkgo biloba* pelo suco gástrico (pH=1,2)

Os resultados do processo de degradação que ocorreu durante as 4 h do ensaio estão na Figura 25..

De um modo geral, verifica-se uma certa degradação dos compostos do extracto de *Ginkgo biloba* pelo suco gástrico. Para o máximo correspondente ao $t_r=17,31$ (1) a degradação dos compostos do extracto pelo suco é cerca de 60%. No segundo máximo de absorvência 2($t_r=18,96$) observa-se o mesmo comportamento. Para o máximo de absorvência 3 ($t_r=21,46$) o composto também sofreu degradação sendo este de cerca de 40%. As semelhanças nas percentagens de degradação dos compostos com o tempo levam a concluir que estes compostos parecem fazer parte da mesma família. Verifica-se que para todos os compostos a degradação estabiliza ao fim de 1 h de digestão.

Não se encontrou termo de comparação com trabalhos da bibliografia, uma vez que não se encontraram trabalhos que estudassem a degradação de extracto aquoso desta planta.

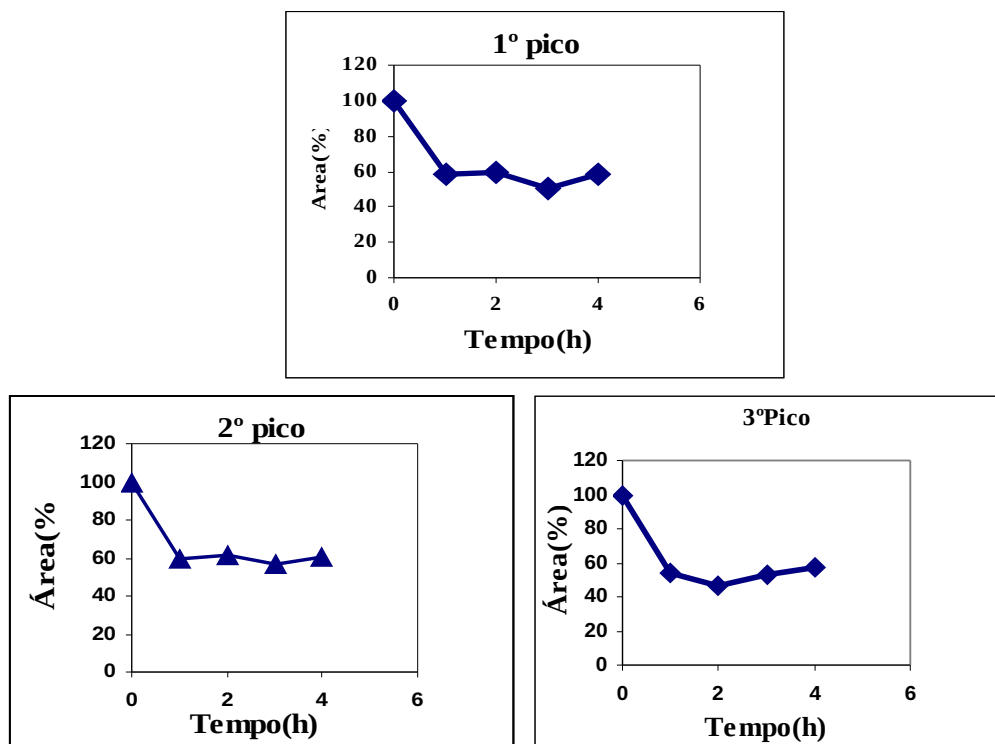


Figura 25 - Representação gráfica da degradação do extracto pelo suco gástrico obtido por HPLC para os 3 máximos de absorvência (pico 1; tr=17,31; Pico2 tr=18,96; Pico 3 tr=21,62)

3.8.2 - Degradação enzimática do extracto de *Ginkgo biloba* pelo suco pancreático (pH 8,0)

De acordo com o descrito no ponto 2.10. Os resultados do processo de degradação que ocorreu durante 4 h encontram-se representados na Figura 26. Verifica-se que o máximo de absorvência 2 (tr=18,96) não sofreu qualquer transformação. Os outros dois máximos de absorvência (tr=17,31 e tr=21,62) sofreram transformação, traduzida pelo desaparecimento dos mesmos e, conseqüentemente, ocorre a

diminuição da sua área. Uma vez que muitos destes compostos podem ser ésteres de ácidos orgânicos pensa-se que tenha ocorrido alguma hidrólise destes compostos com a respectiva formação de outros, esta hipótese é confirmada com o aparecimento de outros máximos de absorvência (Figura não apresentada).

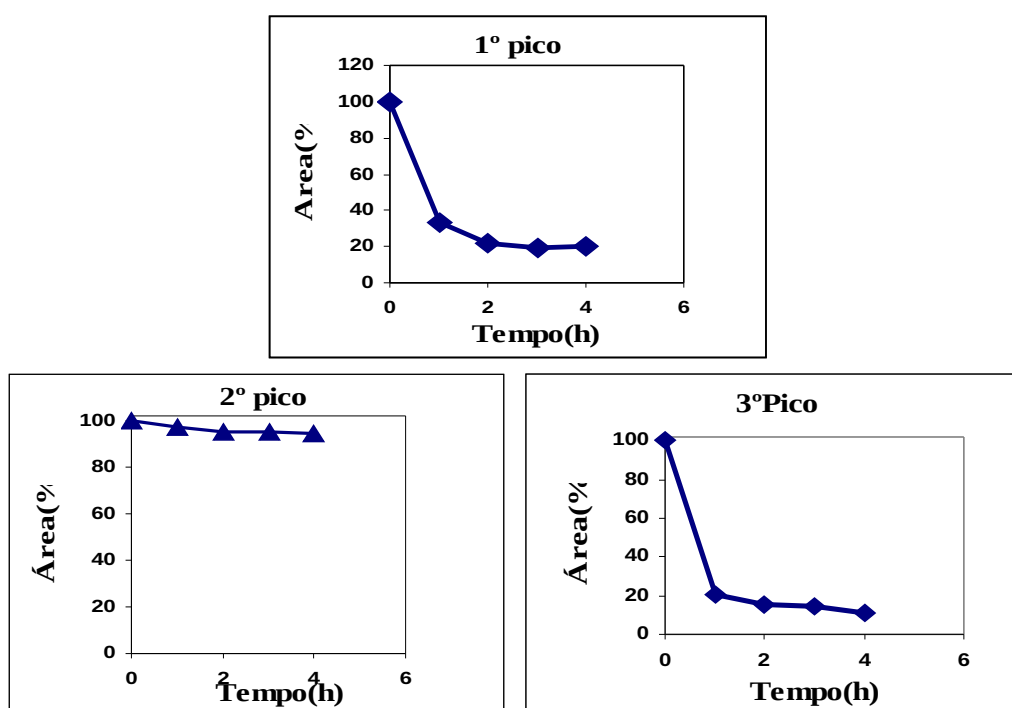


Figura 26-Representação gráfica dos compostos dos extractos obtidos por HPLC correspondente aos máximos de absorvência (pico1 (tr =17,31), Pico 2 (tr =18,96) e pico 3 (tr =21,62)

IV – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1. - Conclusões

A realização deste trabalho teve como objectivo contribuir para a validação científica dos potenciais das plantas medicinais tradicionalmente administradas para o tratamento ou profilaxia de algumas doenças. Tentou-se identificar e quantificar os compostos existentes nos chás das diversas plantas estudadas e estudar a sua potencial actividade como inibidores do enzima acetilcolinesterase; o grau de inibição reflecte a importância de cada extracto para o tratamento da doença de Alzheimer.

Através dos resultados obtidos pode-se concluir o seguinte:

- Todos os extractos possuem uma certa percentagem de inibição do enzima, sendo estes da ordem dos 0,18-0,89 mg/mL. A *Ginkgo biloba* e o N'dembi apresentam maior actividade inibitória da acetilcolinesterase a 50% (0,18 mg/mL e 0,26 mg/mL). Estes resultados são similares aos da galantamina, alcalóide usado no tratamento da doença de Alzheimer e que a uma concentração de 0,25 mg/mL inibe o enzima a 100%.
- Os extractos todos possuem uma boa capacidade antioxidante, cujos valores oscilam entre os 2,6 e 14,3 µg/mL. O maior e melhor resultado foi obtido para a *Ginkgo biloba* com 2,6 µg/mL;
- Detectou-se a presença de fenóis em todos os extractos quantificados entre 34 e 315 µg equivalentes de pirogalol/mg de extracto. A *Ginkgo biloba* e o *Peterospartum tridentatum* (carqueja) apresentam os melhores resultados;
- Não existe uma correlação entre a actividade inibidora da AChE e a quantidade de fenóis totais;
- Existe uma tendência para o aumento da actividade antioxidante e a quantidade de fenóis totais existentes no extracto;
- Pela análise dos extractos de da *Lippia* sp (N'dembi), por HPLC foram identificados compostos derivados do ácido cafeíco, respectivamente, ácido rosmarínico e rutina;

- No estudo da degradação do extracto da *Ginkgo biloba* pelo tracto gastrointestinal observou-se que o suco pancreático pH 8,0 origina uma maior percentagem de degradação dos compostos.
- Identificou-se a epigallocatequina como sendo um dos compostos responsáveis pelas propriedades inibitórias da AChE.

4.2 -.Perspectivas futuras

A realização deste trabalho e os resultados obtidos para os extractos da *Lippia* sp. e *Ginkgo biloba* mostraram-se bastantes promissores no tratamento da doença de Alzheimer quer pela inibição do enzima AChE quer pelas propriedades antioxidantes observadas, o que nos permitiu propor a continuação deste estudo nos seguintes pontos:

1. Identificar as estruturas químicas dos compostos presentes nos extractos responsáveis pelas actividades biológicas estudadas, inibição da acetilcolinesterase e actividade antioxidante.
2. Identificar/Comprovar por MS ou através de outras técnicas os compostos bioactivos presentes nos extractos aquosos de *Ginkgo biloba* e *Lippia* sp (N'dembi) como sendo derivados do ácido cafeíco e ácido rosmarínico.
3. Verificar a acção dos compostos isolados mais activos dos extractos aquosos de *Ginkgo biloba* e *Lippia* sp (N'dembi) sobre actividade da acetilcolinesterase.
4. Estudo etnobotânico da planta N 'dembi e sua biodisponibilidade e metabolismo.
5. Identificação dos compostos que se formam aquando da degradação dos compostos da *Ginkgo biloba* pela acção do suco pancreático e gástrico.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- Abou-Donia M, 2003. Organophosphorous ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health*, 58: 484-497.
- Argyropoulou C, Daferia D, Tarantalis P, Fasseas C, Polissiou M, 2007. Chemical composition of essential oil in Leaves of *Lippia Citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemistry Systems and Ecology*, 35: 831-837.
- Atmani D, Chaher N, Berbucha M, Ayoni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D, 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112: 303-309.
- Auroma O, 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523-524:9-20.
- Behl C, 1997, Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research*, 290: 471-480.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Glund L, Simonetti R, Glund C, 2007. Mortality in Randomized trials of antioxidant supplements for Primary and Secondary Prevention, *Journal of American Medical Association*, 297, 842-857.
- Bilia A, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri F, 2008. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46: 463-470.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H, 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74: 2157-2184.

Cai Y, Luo Q, Sun M, Xing J, Corke H, 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.

Chauhan V, Chauhan A, 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13: 195-208.

Chong Z, Li F, Maise K, 2004. Stress in the brain: novel cellular mechanism of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 49:1-29

Chuenchom O, Yyaem T, Thongnoi W, 2003. Screening for Acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neuronics remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 261-264.

Das A, Shanker, Nath C, Pal R, Singh S, Singh H, 2002. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa* and *Ginkgo biloba* Anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73: 893-900.

Dinamarca M, Arrázola M, Toledo E, Cerpa W, Hancke J, Inestrosa N, 2008. Release of acetylcholinesterase (AChE) from Beta-amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-Transgenic mice. *Chemico-Biological Interactions*, 175:142-149.

Ding S, Dudley E, Plummer S, Tang J, Newton R, Brenton A, 2008. Fingerprint profile of *Ginkgo Biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS, 2008. *Phytochemistry*, 69: 1555-1564.

Falé P, Borges C, Madeira P, Assunção L, Araújo M, Florêncio M, Serralheiro M, 2008. Rosmarinic acid, Scutellaran 4-methyl ether 7-o-glucuronide and (16 S)-Coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (false boldo) *Food Chemistry*, October, (2008)

Ferreira A, Proença C, Serralheiro M, Araújo E, 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidante activity of Medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 31-37.

Frasco M, Founier D, Carvalho F, Guilhermino L, 2006. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquatic Toxicology*, 77: 412-421.

Frasco M, Founier D, Carvalho F, Guilhermino L, 2006. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10: 360-375.

Gomes A, Fernandes E, Lima J, Mira L, Corvo M, 2008. Molecular Mechanisms of Anti-inflammatory Activity Mediated By Flavonoids. *Corrent Medicinal Chemistry*, 2008, 15:1586-1605.

Grosso A, Costa M, Ganço L, Pereira A, Teixeira G, Lavado J, Figueiredo A, Barroso J, Pedro L, 2007. Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grow in Portugal. *Food Chemistry*, 102: 1083-1088.

Grifith R, Hollander J, Okonkwo O, O'Brien T, Watts R, Marson D, 2008. Brain metabolism differs in Alzheimer's and Parkinson's disease dementia. *Alzheimer's and Dementia*, 4: 421-427.

Heinrich M, Teoh H, 2004. Galanthamine from snowdrop - development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal Ethnopharmacology*, 92: 147-162.

Heneka M, O'Banion K, 2007. Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 184: 69-91.

Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F, 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 211-222.

Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenhom K, Yuyaem T, Thongnoi W, 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai

traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 261-264.

Jager L, Perfetti G, Diachenko G, 2006. Analysis of ginkgolides and bilobalide in food products using LC-APCI-MS. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1552-1559.

Júnior C, Bolzani V, Furian M, Fraga C, Barreiro E, 2004. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 27 (4): 655-660.

Justino G, Santos M, Canário S, Borges C, Florêncio E, Mira L, 2004. Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 432: 109-121.

Kamer A, Craig R, Dasanayake A, Brys M, Glodzik-Sobanska L, Leon M, 2008. Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's and Dementia*, 4: 242-250.

Kanatt S, Chander R, Sharma A, 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha Spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100: 451-458.

Khadri A, Serralheiro M, Nogueira J, Neffati M, Smiti S, Araújo E, 2008. Antioxidant and acetylcholinesterase activities of essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C NMR. *Alzheimer's & Dementia*, 4: 242-250.

Križman M, Baričević D, Prošek M, 2007. Determination of compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column. *Journal of pharmaceutical and Biomedical analysis*, 43: 481-485.

Kumaran A, Karunakaran R, 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40: 344-352.

Küpeli E, Tatli I, Akdemir Z., Yesilada E, 2007. Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity on *Geranium pratense* subsp. *finitimum* and its phenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 234-240.

Li W, Fitzloff J, 2002. Simultaneous determination of terpene lactones and flavonoid aglycones in *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 30: 67-75.

Lin H, Ho M, Lau L, Wong K, Shaw P, Wan D, 2008. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 175:352-354.

Lin L, Mukhopadhyay S, Robbins R, Harnly J, 2007. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano *Lippia graveolens*, by LC_DAD-ESI/MS analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 361-369.

Lv H, Wang G, Wu X, Xie L, Huang C, Li H, Hao H, Sun J, 2008. Transport characteristics of ginkgolide B by Caco-2 cells of ginkgolide B oral absorption potential using rat in situ intestinal loop method. *International Journal of Pharmaceutics*, 351: 31-35.

Maksimovic Z, Mlencic D, Kovacevic N, 2004. Polyphenol contents and anti-oxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology* 96: 873-877.

Mark A F, 2007. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology and Therapeutics*, 116: 266-286.

Mata A, Proença C, Ferreira A, Serralheiro M, Nogueira J, Araújo M, 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103: 778-786.

- Mesbah M, Khalifa S, El-Gindy A, Tawfik K, 2005. HPLC determination of certain flavonoids and terpene lactones in selected *Ginkgo biloba* L. *Phytopharmaceuticals. IL Farmaco*, 60: 583-590.
- Miketova P, Schram K, Whitney J, Kerns E, Valcic S, Timmermann B, Volk K, 1998. Mass Spectrometry of selected components of biological interest in green tea. *Journal of Natural Products*, 61: 461-467.
- Mohsen S, Ammar A, 2008. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112: 595-598.
- Mukherjee P, Venkatesan K, Mainak M, Peter J H, 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14: 289-300.
- Oktay, M, Gülcin I, Küfrevioğlu O, 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*, 36: 263-271.
- Orhan I, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yilmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Sener B, Iqbal C M, 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of select Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 103: 1247-1254.
- Pascual E, Slowing K, Carretero E, Mata S, Villar A, 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201-214.
- Pascual E, Slowing K, Carretero M, Villar A, 2001. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 201-214.
- Poestos C, Sereli D, Komatis M, 2004. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chemistry*, 95: 44-52.
- Proença C, Silva A, Roque O, 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa*.

Resende R, Moreira P, Proença T, Despande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira C. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease, 2008. *Free Radical Biology and Medicine*, 44: 2051-2057.

Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N, 2008. Cafeic acid attenuates malathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity. *Toxicology*, 250: 27-31.

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G, 1995. Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7): 933-956.

Sakakibara, H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K, 2003. Simultaneous determination of polyphenols in vegetables, fruits and teas. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 51:571-581.

Shen D, Wu Q, Wang M, Yang Y, Lavoie E, Simon J, 2006. Determination of the predominant catechins in *Acacia catechu* by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Food Chemistry*, 54: 3219-3224.

Singh B, Kaur P, Singh G, Ahuja P, 2008. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia*, 79: 401-418.

Smith D, Cappai R, Barnham K, 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid- β peptide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768: 1976-1990.

Stuchbury G, Münch G, 2005. A Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies. *Journal of Neural Transmission*, 112: 429-453.

Tepe B, Sokmen M, Akpulat H, Sokmen A, 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food chemistry*, 95: 200-204.

Thomas Walle, 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (7): 829-837.

Trvisan M, Macedo F, Van de Meent, K, Verpoorte R, 2003. Selecção de plantas com actividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, 26 (3): 304.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J, 2007. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.

Van-Beek T, 2005, Ginkgolides and bilobalide: Their physical, Chromatographic and spectroscopic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 5001-5012.

van Wyk B-E., 2008. A broad review of commercially important southern African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:342-355

Vasto S, Candor G, Listi F, Balisteri C, Romano G, Malavolta M, Lio D, Nuzzo D, Macchegian E, Bona D, Caruso C, 2008. Inflammation, genes and Zinc in Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, 58: 96-105.

Vazquez G, Fontela E, Santos J, Freire M, Gonzalez–Alvarez J, Antorrena G, 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28: 279-285.

Velazquez D, Xavier H, Batista J, Chaves C, 2005. *Zea mays* extracts modify glomerular function and potassium urinary excretion in conscious rats. *Phytomedicine*, 12:363-369.

Vinutha B, Prashanth D, Salma K, Sreeja S, Pratiti D, Padmaja R, Radhika S, Amit A, Venkateswarlu K, Deepak M, 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Pharmacology*, 109: 359-363.

Yamamoto Y, Yuko T, Mitsuyoshi K, Masaru I, Takashi M, Shigeru S, Hidemasa Y, 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan its hypocholesterolemic effects in rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 10: 13-18.

